

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie**

Oddělení fyziologie buňky



**Sestřih intronu *TUB3i* v buňkách  
mutantních v genu *PRP45***

**The *TUB3* intron splicing  
in *PRP45* mutant cells**

**Jana Konířová**

**2010**

Školitel: Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně,  
na základě konzultací se svým školitelem a s pomocí citovaných literárních zdrojů.

Září 2010

Jana Konířová

Chtěla bych poděkovat všem těm, kteří mi umožnili studovat vysokou školu a vypracovat tuto práci.

Děkuji celé své rodině a především rodičům za poskytnutou podporu.

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za odborné vedení této práce a za velké množství konzultací. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za všechny podněty a rady.

Rovněž upřímně děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Především děkuji Mgr. Ondřeji Gahurovi za mnoho cenných rad, za ochotu mi pomáhat a učit mě nové metody. Děkuji Mgr. Anně Valentové za veškerou pomoc a podporu a můj vděk také patří paní laborantce Evě Krellerové.

# Abstrakt

Protein Prp45 kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* představuje esenciální faktor podílející se na sestřihu pre-mRNA. Již dříve byla v naší laboratoři připravena zkrácená verze genu *PRP45*, *prp45*(1–169), vykazující termosensitivní fenotyp. Tato práce se pokouší přispět k lepší charakterizaci této mutanty.

Testovali jsem citlivost buněk *prp45*(1–169) k inhibitoru polymerace mikrotubulů benomylu a následně jsme zjistili, že nadprodukce Tub3 z plasmidu nalezenou citlivost mutant *prp45*(1–169) k benomylu potlačuje. Dále jsem se zabývali vlivem delece intronů z genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1* na citlivost buněk *prp45*(1–169) ke zvýšené teplotě. Pomocí metody RT-qPCR jsme zjistili, že v důsledku mutace *prp45*(1-169) dochází k výraznému zvýšení hladiny pre-mRNA všech sledovaných genů což by mohlo znamenat, že sestřih v těchto buňkách je poškozen již před první transesterifikační reakcí.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, *PRP45*, intron, *TUB3*, RT-qPCR, benomyl, úpravy pre-mRNA

# Abstract

Protein Prp45, an essential factor of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in pre-mRNA splicing. A truncated version of the *PRP45* gene, *prp45*(1-169), which exhibits a temperature sensitivity, was previously prepared in our laboratory. The aim of this work is to contribute to better understanding of *prp45*(1-169) mutant phenotype. We tested the *prp45*(1-169) strain for its response to microtubule inhibitor benomyl and then we found that *TUB3* overexpression from plasmid rescues discovered *prp45*(1-169) mutant cells hypersensitivity to benomyl. In addition, we studied the influence of *TUB1*, *TUB3*, and *COF1* intron deletion on *prp45*(1-169) strain temperature sensitivity. Using RT-qPCR method we found that *prp45*(1-169) mutation results in the distinctive increase of pre-mRNA level for all tested genes, that could implicate that pre-mRNA splicing in these cells is affected before first transesterification.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *PRP45*, intron, *TUB3*, RT-qPCR method, benomyl, pre-mRNA processing

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
2.1. Protein Prp45.....	10
2.1.1. Skupina SNW proteinů .....	10
2.1.2. Sestřih pre-mRNA.....	12
2.1.3. Mutace prp45(1-169) .....	14
2.2. Introny kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
2.3. Introny genů spojených s cytoskeletem .....	21
2.3.1. Cytoskelet kvasinky <i>S. cerevisiae</i> .....	21
2.3.2. Introny cytoskeletárních genů .....	23
2.4. TUB1 a TUB3 .....	25
2.4.1. Vztah buněčného cyklu a sestřihu pre-mRNA TUB1 a TUB3 .....	27
2.5. ACT1 a COF1 .....	28
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>30</b>
3.1. Materiál .....	30
3.1.1. Seznam použitých organismů .....	30
3.1.2. Kultivační média a roztoky .....	31
3.1.3. Přehled použitých DNA modifikujících enzymů .....	33
3.1.4. Kity pro izolaci a manipulaci nukleových kyselin.....	33
3.1.5. Použité protilátky .....	34
3.1.6. Seznam primerů .....	34
3.1.7. Použité vektory a plasmidy .....	36
3.1.8. Standardy velikostí a množství .....	39
3.2. Metody .....	40
3.2.1. Glycerolové konzervy <i>S. cerevisiae</i> .....	40
3.2.2. Izolace plasmidové DNA .....	40
3.2.3. Izolace plasmidové DNA z <i>S. cerevisiae</i> .....	42
3.2.4. Transformace.....	43
3.2.5. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	45
3.2.6. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu .....	46
3.2.7. Konstrukce nového plasmidu .....	46
3.2.8. Kapkový test .....	47
3.2.9. Příprava proteinových extraktů <i>S. cerevisiae</i> .....	48
3.2.10. Elektroforéza proteinů (PAGE).....	48
3.2.11. Western blot .....	49
3.2.12. Imunodetekce proteinů na membráně .....	50
3.2.13. Amplifikace DNA pomocí PCR.....	50
3.2.14. Izolace RNA.....	52
3.2.15. Reverzní transkripce.....	52
3.2.16. Quantitative real-time PCR.....	52

<b>4. Cíle.....</b>	<b>55</b>
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>56</b>
5.1. Citlivost buněk prp45(1-169) k benomylu nebo calcofluoru .....	56
5.1.1. Test citlivosti kvasinek prp45(1-169) k látkám benomyl a calcofluor white .....	56
5.1.2. Hledání proteinu, který by při nadprodukci reparoval sledovaný fenotyp buněk prp45(1-169) .....	59
5.2. Interakce delece intronů genů TUB1, TUB3 a COF1 s mutací prp45(1-169) .....	64
5.2.1. Příprava kmenů s delecí intronu v genech TUB1, TUB3, resp. COF1 v kombinaci s mutací prp45(1-169) .....	64
5.2.2. Test citlivosti kvasinek JKY01 prp45(1-169) tub1Δi, JKY02 prp45(1-169) tub3Δi a JKY03 prp45(1-169) cof1Δi ke zvýšené teplotě .....	65
5.2.3. Test citlivosti kvasinek JKY01 a TSY02 tub1Δi prp45(1-169) a JKY02 tub3Δi prp45(1-169) k benomylu.....	67
5.3. Detekce exprese genů TUB1, TUB3, COF1 a ACT1 pomocí metody RT qPCR .....	69
5.3.1. Testované kmeny .....	70
5.3.2. Primery použité pro qPCR .....	71
5.3.3. Vliv mutace prp45(1-169) na expresi sledovaných genů.....	73
5.3.4. Vliv delece intronu z genů TUB1, TUB3 a COF1 na expresi těchto genů v buňkách prp45(1-169) .....	77
5.3.5. Vliv mutace v intronu genu COF1 na expresi tohoto genu.....	79
<b>6. Diskuze .....</b>	<b>81</b>
6.1. Citlivost kvasinek <i>S. cerevisiae</i> prp45(1-169) ke calcofluoru, k benomylu a ke zvýšené teplotě .....	81
6.1.1. Citlivost buněk prp45(1-169) ke calcofluoru .....	81
6.1.2. Citlivost buněk prp45(1-169) k benomylu a hledání proteinu, který by při nadprodukci reparoval sledovaný fenotyp.....	83
6.1.3. Vliv delecí intronů genů TUB1, TUB3 a COF1 na termosenzitivitu buněk prp45(1-169).....	84
6.1.4. Vliv delecí intronů genů TUB1 a TUB3 na citlivost buněk k benomylu.....	85
6.2. Exprese genů TUB1, TUB3, COF1 a ACT1 sledovaná metodou RT qPCR.....	87
6.2.1. Vliv delece intronu z genů TUB1, TUB3 a COF1 a mutace prp45(1-169) na hladinu mRNA těchto genů .....	87
6.2.2. Vliv mutace prp45(1-169) na hladinu pre-mRNA sledovaných genů.....	88
6.2.3. Vliv mutace v intronu genu COF1 na expresi tohoto genu.....	90
<b>7. Souhrn.....</b>	<b>91</b>
<b>8. Seznam literatury .....</b>	<b>92</b>

# Seznam zkratek

<b>aa</b>	aminokyselinový zbytek
<b>ADP</b>	adenosindifosfát
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>bp</b>	počet párů bazí (base pair)
<b>CFW</b>	Calcofluor White
<b>(d)NTP</b>	(deoxy)ribonukleosidtrifosfát (směs dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	etylendiamintetraoctová kyselina
<b>GFP</b>	fluorescenční značka (green fluorescence protein)
<b>HA</b>	hemaglutinin
<b>kDa</b>	kiloDalton – jednotka molekulové hmotnosti
<b>kbp</b>	počet tisíců párů bází (kilo base pair)
<b>nt</b>	nukleotid(y)
<b>NTC</b>	nineteen complex (= Prp19p-asociovaný komplex)
<b>OD</b>	optická densita
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PEG</b>	polyetylenglykol
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>snRNA</b>	malá jaderná ribonukleová kyselina
<b>snRNP</b>	malá jaderná ribonukleoproteinová částice
<b>TAE</b>	pufr Tris-acetát-EDTA
<b>WT</b>	divoký typ (wild type)



# 1.Úvod

Informace kódující protein je v mnoha eukaryotických genech rozdělena do exonů, které musí být spojeny za vzniku mRNA procesem odstraňujícím vymezené nekódující sekvence - introny. Tento komplikovaný proces, kterého se v jádře buňky účastní pět malých jaderných RNA a mnoho proteinů, se nazývá sestřih pre-mRNA (splicing). Sestřih pre-mRNA je u pučící kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v porovnání s vyššími eukaryoty výrazně jednodušší a pouze menšina genů obsahuje intron. Význam a funkce intronů u těchto kvasinek jsou tak dosud předmětem intenzivního studia.

V naší laboratoři se zabýváme genem *PRP45*, který kóduje faktor podílející se na sestřihu pre-mRNA. Byla vytvořena termosenzitivní varianta tohoto genu; zkrácená verze *prp45(1-169)*. Ve své práci jsem se zabývala charakterizací fenotypu této mutanty. Testovali jsme citlivost k několika inhibitorům (benomyl, calcofluor white) a hledali jsme proteiny, které by při nadprodukci tuto citlivost potlačovali. Dále jsme sledovali vliv delecí několika vybraných intronů genů spojených s cytoskeletem na fenotyp buněk *prp45(1-169)*. Pomocí metody RT-qPCR jsme sledovali změny exprese vybraných cytoskeletárních genů v závislosti na mutaci *prp45(1-169)*, delecí vybraných intronů a mutaci v intronu jednoho z těchto genů.

## 2. Literární přehled

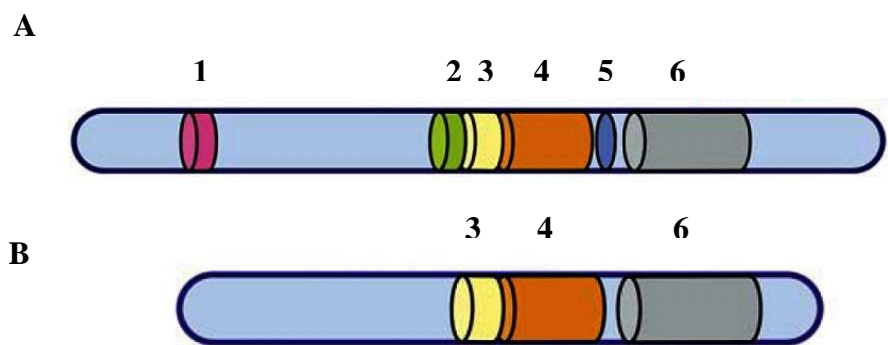
### 2.1. Protein Prp45

#### 2.1.1. Skupina SNW proteinů

Proteiny patřící do této skupiny se vyznačují přítomností SNW motivu (vysoce konzervované sekvence SNWKN), který se nachází přibližně v polovině aminokyselinového řetězce (Folk *et al.*, 1996). Zástupce rodiny SNW proteinů je možné nalézt u mnoha eukaryotických organismů. Jedná se o proteiny esenciální převážně se vyskytující v jádře buňky. Ortologní protein člověka nese alternativní názvy SKIP/NCoA-62/SNW1 (Dahl *et al.*, 1998; Baudino *et al.*, 1998), ortologní kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je Prp45 (Albers *et al.*, 2003) a kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* Snw1 (Ambrozkova *et al.*, 2001).

Lidský SNW1/SKIP může v buňkách fungovat jako korepresor nebo koaktivátor transkripce. Tento protein je schopen interagovat s velkým množstvím dalších faktorů. SNW1/SKIP interaguje s protoonkogenem Ski (od toho odvozeno druhé jméno proteinu: SKIP: Ski interacting protein; Dahl *et al.*, 1998). SKIP se také váže jako koaktivátor na ligand vazebnou doménu jaderného hormonálního receptoru pro vitamin D (Baudino *et al.*, 1998), a podílí se tak na expresi genů pod vlivem jaderných receptorů steroidních hormonů (Zhang *et al.*, 2003). Rovněž byla nalezena interakce s komponenty komplexů souvisejících se signalizací přes TGF- $\beta$  receptory (Leong *et al.*, 2001) a Notch receptor (Zhou *et al.*, 2000). SKIP se váže i na komplex E2F/pRb, kde se spolu s proteinem Ski podílí na uvolnění transkripčního faktoru E2F z komplexu (Prathapam *et al.*, 2002), podobný je i princip interakce SKIP s onkoproteinem E7 lidského papillomaviru HPV-16 (Prathapam *et al.*, 2001). Nově byla nalezena například i interakce SKIP s death domain-associated proteinem, který se podílí na regulaci apoptózy (Tang *et al.*, 2005) a asociace s P-TEFb, která vede k ovlivnění translace a sestřihu viru HIV (Bres *et al.*, 2005). Protein SNW1/SKIP se dále také podílí na sestřihu pre-mRNA. Bylo zjištěno, že tento protein je součástí sestřihových komplexů (Makarov *et al.*, 2002) a jeho účast na sestřihu potvrzuje i další práce, která prokázala, že inhibice SKIP vede k poškození sestřihu reportérového minigenu koregulovaného proteinem SKIP (Zhang *et al.*, 2003).

Prp45, ortolog SNW proteinů z kvasinky *S. cerevisiae*, je protein nezbytný pro sestřih pre-mRNA. Od ostatních proteinů ze skupiny SNW se liší nepřítomností N-koncové oblasti zahrnující G-bohatou oblast a tím, že polyprolinový motiv (nacházející se u vyšších eukaryot) je redukován pouze na dva proliny (Obr. 1).



Obr. 1 Schématické znázornění SNW proteinů vyšších eukaryot (A) a Prp45 (B).

Barevně jsou zvýrazněny jednotlivé motivy: 1: glycin bohatá oblast; 2: polyprolinový motiv; 3: SNW motiv; 4: helikální motiv; 5: oblast nízké complexity, druhově specifické inzerty; 6: SH2-like doména (dle Folk *et al.*, 2004)

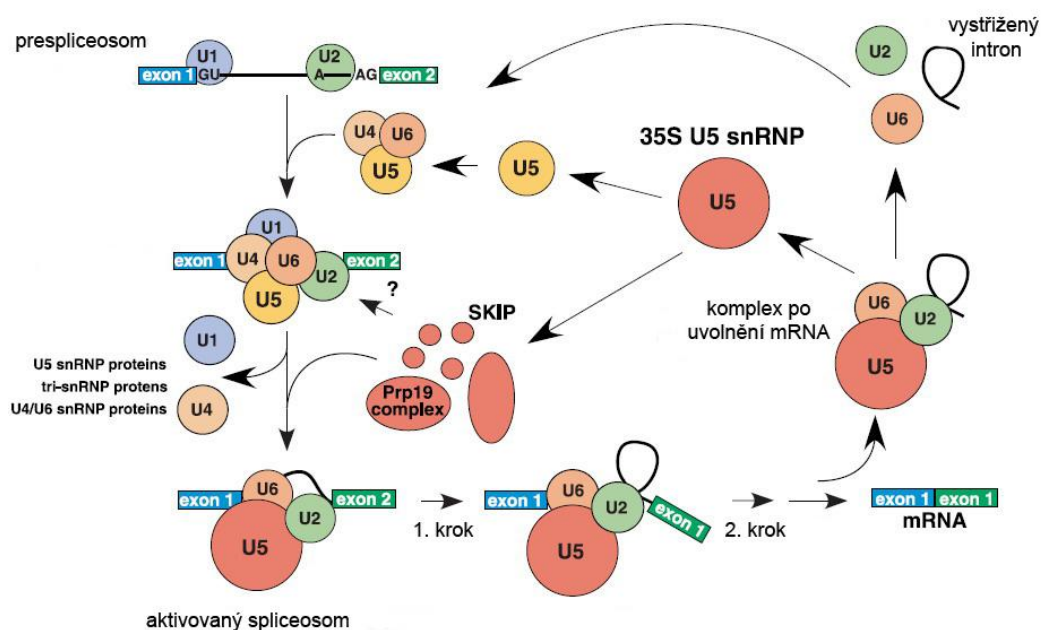
### 2.1.2. Sestřih pre-mRNA

Přepisem genů RNA polymerázou II vzniká primární transkript, který je dále upravován. Jednou z úprav je odstranění protein nekódujících sekvencí tzv. intronů. Tento proces se označuje jako sestřih pre-mRNA (splicing) a je zprostředkován ribonukleoproteinovým komplexem nazývaným spliceosom. Introny jsou v kvasince *S.cerevisie* rozpoznávány spliceosomem zejména podle tří konzervovaných oblastí: 5' sestřihového místa (většinou GUAUGU), místa větvení (branchpoint, většinou UACUAAC) a 3' sestřihového místa (většinou  $U/C$  AG; Spingola *et al.*, 1999). Spliceosom se skládá z pěti konzervovaných snRNA (small nuclear RNAs): U1, U2, U4, U5 a U6, označení U je odvozeno od vysokého podílu uracilu v těchto molekulách, z proteinů, které spolu s snRNA vytváří komplexy nazývané snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particules) a z dalších non-snRNP proteinů.

Sestřih pre-mRNA probíhá ve dvou krocích, ve dvou transesterifikačních reakcích. V prvním kroku 2' hydroxylová skupina adenosinu v místě větvení naruší fosfodiesterovou vazbu v 5' sestřihovém místě za vzniku lasovité struktury (lariát-exon 2) a v druhém kroku sestřihu 3' hydroxylová skupina na konci prvního exonu naruší fosfodiesterovou vazbu v 3' sestřihovém místě a tím dojde ke spojení exonů.

Sestavování spliceosomu začíná interakcí U1 snRNP s 5'sestřihovým místem pre-mRNA a vazbou U2 snRNP do oblasti místa větvení (branchpoint). Dále dochází k připojení U4/U6•U5 snRNP a dalších non snRNP proteinů. Poté dochází k aktivaci spliceosomu, která představuje přechod do konformace umožňující zahájení prvního kroku sestřihu. Při aktivaci dojde k uvolnění U1 snRNP, k rozvolnění interakce mezi U4 a U6 snRNA a k disociaci U4 snRNP od spliceosomu (Staley and Guthrie, 1998). Po oddělení U1 a U4 snRNP se ke spliceosomu váže komplex NTC (Prp19 asociovaný komplex, nineteen complex; Tarn *et al.*, 1994). Tento komplex je pravděpodobně důležitý pro stabilizaci vazby U5 a U6 snRNP na spliceosom a pre-mRNA, při které dochází ke změně párování mezi U6 snRNA a pre-mRNA (Chan *et al.*, 2003).

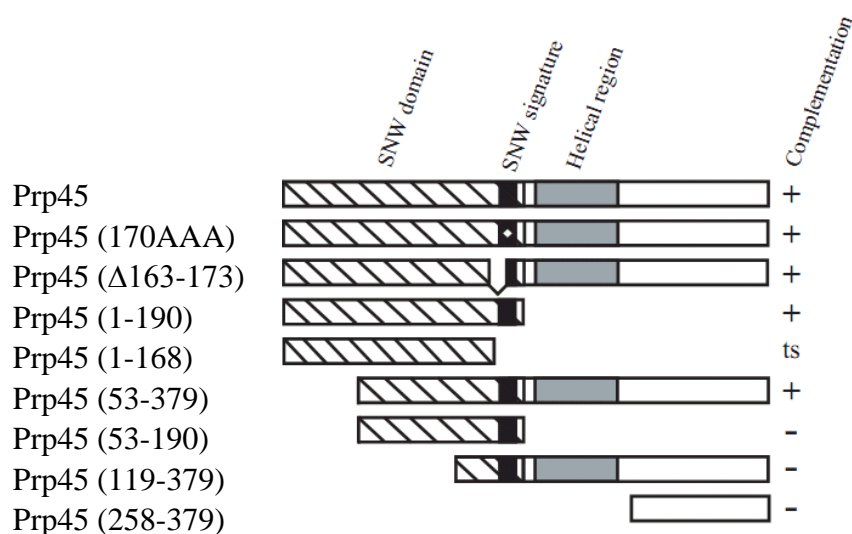
Při izolaci proteinů asociovaných s některými faktory komplexu NTC byl identifikován i protein Prp45 (Gavin *et al.*, 2002; Ohi *et al.*, 2002) i když není jisté, zda je Prp45 přímo interním členem NTC komplexu (Albers *et al.*, 2003). Bylo také zjištěno, že lidský ortolog kvasinkového Prp45 SKIP vstupuje do sestřihu ve stejné fázi jako komplex NTC (Obr. 2; Makarov *et al.*, 2002).



Obr. 2 Vstup komplexu NTC a proteinu ze skupiny SNW (SKIP) do sestřihu (dle Makarov *et al.*, 2002)

### 2.1.3. Mutace *prp45(1-169)*

Prp45, o délce 379 aminokyselinových zbytků, je esenciální jaderně lokalizovaný protein. V naší laboratoři byly vytvořeny plasmidy nesoucí různé N i C-koncové deleční varianty genu *PRP45*. Tyto plasmidy byly vloženy do diploidního kmene *PRP45/prp45Δ* a bylo sledováno, které deleční varianty jsou po sporulaci schopné obnovit růst buněk *prp45Δ*. Bylo zjištěno, že gen *PRP45* toleruje rozsáhlé zkrácení (Obr. 3; Martinkova *et al.*, 2002; Gahura *et al.*, 2009).



Obr. 3 Deleční varianty proteinu Prp45

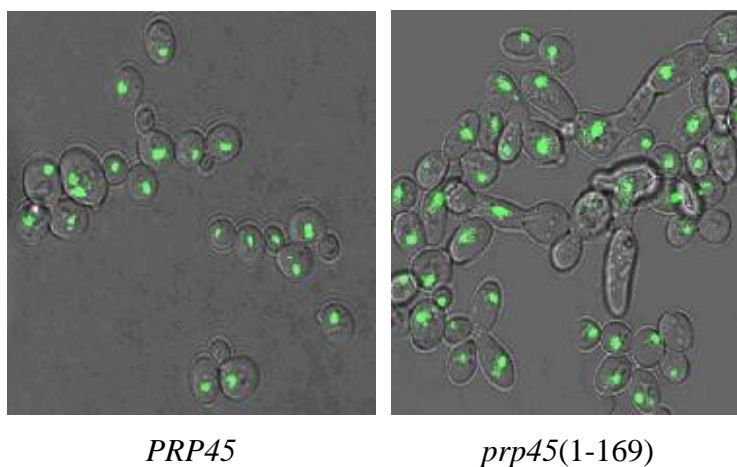
Prp45 (170AAA) představuje mutaci v SNW motivu; Prp45 (Δ163-173) označuje delecí deseti aminokyselin uvnitř SNW motivu.

+ schopnost komplementace, ts termosenzitivní fenotyp

(Martinkova *et al.*, 2002; Gahura *et al.*, 2009)

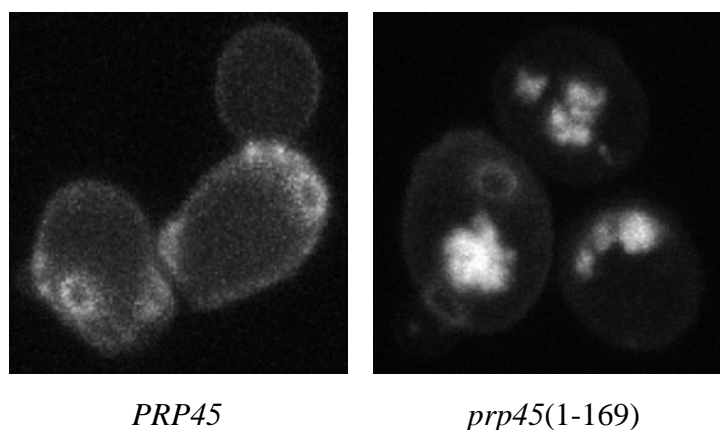
Buňky nesoucí na plasmidu zkrácenou verzi 1-168 byly termosenzitivní. Pro další studium této mutace byla pomocí primery řízené homologní rekombinace vytvořena genomová mutace *prp45(1-169)*-HA::kanMX6 (Gahura *et al.*, 2009).

Kvasinky nesoucí mutaci *prp45(1-169)* jsou citlivé ke zvýšené teplotě 37°C. I během růstu při teplotě 30°C vykazují drobný růstový defekt, je možné pozorovat prodloužení a deformaci tvaru buněk (Obr. 4). Dále byl u těchto mutantních kvasinek pozorován poškozený sestřih nestandardních intronů (mutace v místě větvení). Buňky *prp45(1-169)* jsou také citlivé k mikrotubulárnímu inhibitoru nocodazolu (Gahura *et al.*, 2009) a při barvení fluorescenčním barvivem calcofluor white je možné u buněk kultivovaných krátce ve 37°C pozorovat aberantní hromadění chitinu ve stěně těchto buněk (Obr. 5; Abbrhámová, 2010).



Obr. 4 Aberantní tvar *prp45(1-169)* buněk při 30°C

Vizualizace jádra pomocí Cbf5-Gfp (Gahura *et al.*, 2009)



Obr. 5 Aberantní depozice chitinu ve stěně *prp45(1-169)* buněk při 37°C

Barveno calcofluorem (Abbrhámová, 2010)

## 2.2. Introny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Na rozdíl od bakterií se většina genů eukaryotických organismů skládá z krátkých úseků kódujících proteiny (exonů) a z velkého počtu nekódujících oblastí (intronů). Introny jsou odstraňovány během procesu sestřihu za vzniku mRNA, která nese informaci potřebnou pro biogenezi proteinu. U různých eukaryotických organismů existují velké rozdíly v počtu a délce intronů. U mnohobuněčných organismů je ve většině genů přítomen alespoň jeden intron, obvykle jich je ale více. Například v lidském genomu 95% genů má intron a jeden gen v průměru obsahuje sedm intronů (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

V porovnání s vyššími eukaryoty jsou u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* distribuce intronů v genomu i proces sestřihu výrazně jednodušší (Spingola *et al.*, 1999). Kvasinka *S. cerevisiae* obsahuje pouze 296 intronů nacházejících se v 283 genech, které představují 5% z celkového počtu přibližně 6000 genů této kvasinky. U těchto kvasinek se většinou vyskytuje v genu pouze jeden intron. Velice malé procento intronů představuje funkční RNA (Ooi *et al.*, 1998; Villa *et al.*, 1998).

Existuje více hypotéz, které se pokouší tuto jednoduchost sestřihu u kvasinek *S. cerevisiae* vysvětlit. První, ne příliš pravděpodobná, předpokládá, že introny se u kvasinek objevily teprve nedávno a jejich funkce proto nemohla být zatím dostatečně rozvinuta. Podle další hypotézy jsou introny u *S. cerevisiae* pouhé relikty odstraňované z genomu kvasinky během procesu evoluce. Je známo, že introny (a stejně tak mnoho proteinů zapojených do sestřihu) u hemiascomycet prošly masivní redukcí v průběhu evoluce (Aravind *et al.*, 2000; Bon *et al.*, 2003). Byl navržen model mechanismu odstraňování intronů z genomu prostřednictvím homologní rekombinace řízené c-DNA vzniklou reverzní transkripcí (Fink, 1987). Pokud by tento model byl správný, pak by se dalo předpokládat, že introny budou odstraněny nejprve z nejčastěji přepisovaných genů. Této domněnce odporuje fakt, že většina intenzivně přepisovaných ribosomálních genů kvasinky *S. cerevisiae* intron obsahuje (Ares *et al.*, 1999).



Transkripty genů obsahující intron představují 27% celkové mRNA v buňce a 90% mRNA z genů obsahujících intron pochází z přepisu genů pro ribosomální proteiny. Většina (71%) ribosomálních genů totiž obsahuje intron. Kolem 24% celkové buněčné mRNA je tak produktem transkripce ribosomálních genů obsahujících intron. Autoři z uvedených dat vyvozují, že introny mohou hrát důležitou roli při regulaci biogeneze ribosomů (Ares *et al.*, 1999).

Vliv intronů obecně na fungování kvasinkové buňky nebyl zatím úplně objasněn, ale výsledky několika studií naznačují, že některé introny mohou mít důležitou roli při regulaci genové exprese (Juneau *et al.*, 2006, 2007). Bylo zjištěno, že geny, které obsahují intron, jsou více transkribovány (vzniká 3,9 krát více mRNA) i translatovány (vzniká 3,3 krát více proteinu) než jejich bezintronové protějšky (Juneau *et al.*, 2006).

U mnohobuněčných organismů mají introny významný vliv na proces genové exprese. Mohou mimo jiné ovlivňovat transkripci a vazbu nukleosomu (Liu *et al.*, 1995; Sleckman *et al.*, 1996). Přesto se dá tvrdit, že hlavní přínos sestřihu pre-mRNA spočívá u většiny eukaryot v možnosti alternativního sestřihu. Možnosti uplatnění alternativního sestřihu v regulaci jsou však u kvasinek *S. cerevisiae* minimální, a to i proto, že pouze minimum genů obsahuje více než jeden intron.

Vznik více proteinů z jednoho transkriptu v důsledku sestřihu je znám pouze u dvou genů. *SRC1* obsahuje jeden intron na 3' konci pre-mRNA. Tento intron obsahuje dvě alternativní 5' sestřihová místa (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2002). Sestřih z 5' sestřihového místa s méně konzervovanou sekvencí vede ke vzniku zkrácené verze proteinu s výrazně sníženou aktivitou. Není zcela jasné, zda zkrácená forma proteinu má v buňce nějakou vlastní specifickou funkci, ale nezdá se to příliš pravděpodobné (Grund *et al.*, 2008). Na rozdíl od předchozího příkladu produkt genu *PTC7* je alternativně sestřihován za vzniku dvou mRNA, které kódují dva proteiny s odlišnou lokalizací a funkcí (Juneau *et al.*, 2009).

U kvasinek *S. cerevisiae* byl nalezen systém regulace hladiny proteinu prostřednictvím regulovaného sestřihu. Za určitých podmínek je sestřih některých intronů výrazně potlačen, a tím dochází k neefektivní translaci, buď v důsledku posunu čtecího rámce nebo proto, že intron obsahuje nonsense kodon. Tento typ regulace se týká meiotických genů (Engbrecht *et al.*, 1991; Nakagawa and Ogawa, 1999; Juneau *et al.*, 2007), ale i autoregulace genů *RPL32* a *YRA1* (Li *et al.*, 1996; Preker *et al.*, 2002). Jako příklad mechanismu autoregulace může sloužit gen *RPL32*. Určitá sekvence nukleotidů z exonu 1 genu *RPL32* interaguje s intronem za vzniku struktury vázající protein L32 a regulující sestřih (Li *et al.*, 1996). Regulaci sestřihu je možné často pozorovat při exponenciálním růstu buněk v komplexním médiu. Bylo zjištěno, že sestřih všech třinácti genů specifických pro meiózu, které obsahují intron, je za těchto podmínek regulován. Obecně bylo zjištěno, že během růstu v komplexním médiu dochází k poklesu sestřihu až u 16 % genů s intronem (Juneau *et al.*, 2007).

Průměrná délka intronu *S. cerevisiae* je 270 nukleotidů. Nejdelší intron (DBP2) má délku 1 001nt a nejkratší (intron 2 z MATa1) 52 nt. Graf rozdělení intronů podle délky je výrazně bimodální. Jeden vrchol je v okolí 100 nukleotidů a druhý blízko 400 nt (Spingola *et al.*, 1999). Důvod pro toto rozdělení není znám, ale je hypoteticky možné, že souvisí s rozložením nukleozomů podél genu (Vaillant *et al.*, 2010).

Průměrná vzdálenost mezi bodem větvení a 3' sestřihovým místem je 39 nukleotidů. Tato délka může být důležitá i pro proces sestřihu. Na základě výsledků sestřihu mutantních verzí *ACT1* intronu bylo zjištěno, že pokud je vzdálenost mezi bodem větvení a 3' sestřihovým místem delší než určitý limit jsou pro sestřih in vitro nezbytné některé faktory: Slu7 pro vzdálenost větší než 9 nt, Prp18 pro vzdálenost větší než 12 nt a Prp22 pro vzdálenost větší než 21 nt (Brys and Schwer, 1996; Zhang and Schwer, 1997; Schwer and Gross, 1998).

Novější studie ale naznačuje, že toto pozorování nelze aplikovat na všechny přirozené introny vyskytující se v buňce kvasinky *S. cerevisiae*. Při srovnání genů podle zmíněné vzdálenosti s výsledky z microarray, které ukazovaly míru poškození sestřihu u kmene *prp18Δ*, nebyla nalezena žádná korelace. Autoři ověřili tyto výsledky pomocí RT-PCR. Zjistili, že sestřih některých intronů s krátkou vzdáleností mezi bodem větvení a 3' sestřihovým místem nebyl významně ovlivněn v kmeni *prp18Δ* ani v kmeni *prp17Δ*. Nalezli ale dva geny, které mají zmiňovanou vzdálenost krátkou, a přesto byl jejich sestřih zhoršený. Zároveň také zjistili, že sestřih mnoha genů s dlouhou vzdáleností mezi bodem větvení a 3' sestřihovým místem nebyl delecí *prp18Δ* nebo *prp17Δ* výrazně ovlivněn. Příkladem může být gen *TUB3* s velice dlouhou vzdáleností 139 nt, jehož sestřih delecí zmíněných sestřihových faktorů ovlivnila jen velmi málo (Clark *et al.*, 2002).

Na základě svých výsledků tvrdí autoři určité studie, že existuje vztah mezi délkou, pozicí intronu a mírou genové exprese. Čím blíže je intron k začátku transkripce a čím je intron delší tím vyšší je hladina exprese daného genu (Juneau *et al.*, 2006). Vliv intronu v blízkosti promotoru na genovou expresi byl detekován i u jiných organismů (Furger *et al.*, 2002).

Delece intronu z některých esenciálních genů kvasinky *S. cerevisiae* má podle určitých výsledků vliv na růst těchto buněk, a to jak v komplexním médiu (zhoršení růstu buněk s delecí *glc7Δi*), tak i médiu s inhibítorem (týká se buněk *glc7Δi* v médiu s cantharidinem a *act1Δi* buněk v médiu s latrunculinem). U těchto buněk s delecí vybraných intronů (*glc7Δi*, *act1Δi*, *pre3Δi*) bylo také pozorováno 27% snížení hladiny mRNA těchto genů (Juneau *et al.*, 2006). Pokles genové exprese po delecí intronu byl pozorován i u jiných genů (např.: DBP2; Barta and Iggo, 1995). Těmto zjištěním odporují výsledky jiné studie, které ukazují, že při delecí intronů z genů spojených s cytoskeletem (tj. i *act1Δi*) nedošlo ani k poklesu hladiny mRNA ani ke snížení množství proteinu v buňce (Parenteau *et al.*, 2008).

Autoři této studie ve své práci pomocí delecí intronů prokázali, že pro kvasinkovou buňku není přibližně jedna třetina intronů esenciální. Zároveň ale zjistili, že delecí přibližně 20% intronů způsobí malou změnu růstu buněk za zvláštních podmínek, tj. v přítomnosti určitých inhibitorů v médiu nebo při růstu v médiu s alternativním zdrojem uhlíku. Nalezli pouze tři geny (*MTR2*, *YRA1* a *TAD3*), u kterých delece intronů způsobila vážné růstové defekty. Pokud byly bezintronové verze těchto genů exprimovány pod heterologním promotorem (*ACT1* promotor) došlo u těchto buněk k plnému obnovení růstu. Z toho vyplývá, že introny těchto genů se pravděpodobně podílí na regulaci (zesílení) genové exprese, jsou-li pod vlastním promotorem (Parenteau *et al.*, 2008).

## 2.3. Introny genů spojených s cytoskeletem

### 2.3.1. Cytoskelet kvasinky *S. cerevisiae*

Cytoskelet je v kvasince *S. cerevisiae* esenciální pro mnoho buněčných procesů: dělení buňky, segregace chromosomů, pohyb organel a jejich lokalizace, tvorba pupenu, polarizovaný růst, sekrece a endocytóza.

Mikrotubuly jsou hlavní komponentou mitotického i meiotického vřetenka a jsou nezbytné pro pohyby jádra během buněčného dělení a křížení kvasinek. Mikrotubulární systém se skládá z mikrotubulů, s mikrotubuly asociovaných proteinů (MAP) a mikrotubuly organizujícího centra (MTOC), také nazývaného spindle pole body (SPB). Existují dva typy mikrotubulů, které se v buňce účastní různých procesů. Cytoplazmatické mikrotubuly vychází z SPB a jsou lokalizovány v cytoplasmě. Podílí se na udržení pozice jádra v buňce, na migraci jádra do oblasti krčku při mitóze a na pohybu obou nově vzniklých jader. Jaderné mikrotubuly také vycházejí z SPB, ale nacházejí se v jádře. Jejich hlavní funkcí je segregace chromosomů během mitózy i meiózy (shrnutí v Winsor and Schiebel, 1997).

Mikrotubuly se skládají z tubulinových heterodimérů. Heterodimér je tvořen tubulinem  $\alpha$  a tubulinem  $\beta$ . V kvasinkách *S. cerevisiae* existují dva geny pro tubulin  $\alpha$  *TUB1* a *TUB3*. Tyto geny jsou vysoce homologní, ale gen *TUB1* je v buňkách exprimován mnohem více než gen *TUB3* (Schatz *et al.*, 1986a; Schatz *et al.*, 1986b). Gen *TUB2* kóduje tubulin  $\beta$  (Neff *et al.*, 1983). Na formování tubulinů se podílí další proteiny (Stearns *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1994). Genom kvasinky *S. cerevisiae* dále obsahuje gen *TUB4*, který je součástí SPB a funguje jako tubulin  $\gamma$  (Sobel and Snyder, 1995).

Každá buňka obsahuje velké množství proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP). Tyto proteiny lze rozdělit do dvou velkých skupin: Jednu skupinu tvoří molekulové motory, které zajišťují především transport podél mikrotubulů. Molekulové motory kinesinového typu se také podílí na dělení buněk. Do druhé skupiny MAP patří proteiny, které se váží na mikrotubuly a regulují jejich dynamiku (shrnutí v Winsor and Schiebel, 1997).

Mikrofilamenta se skládají z aktinu, který je schopen interagovat s mnoha dalšími proteiny. Mikrofilamenta se podílí především na polarizovaném růstu buňky a na tvorbě pupene. Po indukci buněk feromonem dochází ke vzniku specifického tvaru buňky označovaného „schmoo“ na jehož formování se také podílí mikrofilamenta.

Buňky obsahují velké množství aktinu. Tento protein schopný vázat a štěpit ATP se vyskytuje v buňce buď v podobě monomerů (G-aktin), nebo filament (F-aktin). Aktin je v kvasinkách *S. cerevisiae* kódován jedním esenciálním genem *ACT1*. S mikrofilamenty (stejně jako s mikrotubuly) je asociované velké množství dalších proteinů. Po mikrofilamentech se pohybují molekulové motory myosinového typu a existuje velké množství proteinů, které váží aktin. Tyto proteiny se dělí podle toho, zda se váží na monomery nebo na mikrofilamenta. Příkladem proteinu vážícího monomery je profilin. Tento protein se podílí na organizaci aktinového cytoskeletu, je schopen fungovat jako „actin monomers sequestering protein“ a zároveň aktivuje na vázaných monomerech výměnu ADP za ATP. Příkladem proteinu vážícího se na mikrofilamenta může být cofilin, který se podílí na štěpení mikrofilament. Další příklad představuje protein Sac6, který působí jako „actin-bundling protein“ a je, ve spolupráci s proteinem Scp1, nezbytný pro organizaci a správnou funkci aktinového cytoskeletu (shrnutí v Winsor and Schiebel, 1997).

V kvasinkách se dále také vyskytují proteiny příbuzné k aktinu tzv. actin-related proteins (ARP). Tyto proteiny měly pravděpodobně s genem pro aktin společného předka a některé jejich funkční charakteristiky jsou aktinu velmi podobné. ARP proteiny je možné nalézt i u jiných organismů. Do této rodiny proteinů patří například kvasinkové proteiny Arp2 a Arp3, které jsou součástí v evoluci vysoce konzervovaného komplexu Arp2/3 nezbytného pro organizaci aktinového cytoskeletu (Mullins *et al.*, 1996).

### 2.3.2. *Introny cytoskeletárních genů*

V kvasince *S. cerevisiae* existuje patnáct genů spojených s cytoskeletem, které obsahují celkem šestnáct intronů (Tab. 1). Zhruba polovina těchto genů je pro kvasinku esenciální.

Kumulovaná delece intronů ze všech genů spojených s cytoskeletem nezpůsobuje výrazný růstový defekt. Tento závěr byl vyvozen z výsledků studie, ve které autoři pomocí křížení získali kmen nesoucí deleci všech šestnácti intronů z patnácti genů spojených s cytoskeletem. Pokusili se tak demonstrovat vliv sestřihu a jeho odstranění na jednu celou buněčnou strukturu (Parenteau *et al.*, 2008).

Kvasinkové buňky nesoucí tyto kumulované delece intronů nevykazují žádný defekt růstu při kultivaci v komplexním médiu. U některých buněk nesoucích deleci určitého intronu došlo k malé změně ve schopnosti kompetovat v kultuře s buňkami divokého typu. Tři jednotlivé delece intronu působí pokles a naopak deset jednotlivých delecí intronu zvýšení schopnosti kompetice u kmenů s touto mutací o 10 až 20% (Parenteau *et al.*, 2008). Vzhledem k rozdílnému vlivu jednotlivých delecí intronů na životaschopnost kvasinkové buňky, pravděpodobně neexistuje žádný efekt specifický pro deleci všech šestnácti intronů z genů spojených s cytoskeletem.

standardní název	systematický název	počet intronů	délka intronu (nt)	překryv s jiným ORF	esenciální	funkce
ACT1	YFL039C	1	308	ne	ano	Aktin; strukturní protein mikrofilament
SAC6	YDR129C	1	111	ne	ne	Fimbrin, actin-bundling protein; organizace actinového cytoskeletu
COF1	YLL050C	1	179	ne	ano	Cofilin; štěpí aktinová filamenta
PFY1	YOR122C	1	208	ne	ano	Profilin, váže aktin; dynamika actinového cytoskeletu
ARP2	YDL029W	1	123	ne	ano	Actin-related protein, součást ARP2/3 komplexu; polarita a motilita buněk
ARP9	YMR033W	1	86	ne	ano	Actin-related protein; remodelace chromatinu
LSB3	YFR024C-A	1	94	ne	ne	Váže Las17p, který se podílí na skládání actin patches a polymeraci actinu
YSC84	YHR016C	1	167	ne	ne	Váže se na aktinová filamenta
TUB1	YML085C	1	116	ne	ano	Majoritní gen pro $\alpha$ -tubulin; společně s $\beta$ -tubulinem tvoří mikrotubuly
TUB3	YML124C	1	298	ne	ne	Minoritní gen pro $\alpha$ -tubulin
GIM5	YML094W	1	83	ano	ne	Podjednotka cochaperonového komplexu, podílí se na skládání tubulinu
CIN2	YPL241C	1	80	ne	ne	GAP pro Cin4p, který se podílí na skládání $\beta$ -tubulinu
MOB1	YIL106W	1	84	ne	ano	Podílí se na cytokinezi a udržení ploidie
MOB2	YFL034C-B	1	114	ne	ne	Podílí se na cytokinezi a udržení ploidie
DYN2	YDR424C	2	96 80	ne	ne	Lehký řetězec microtubulárního motoru dyneinu

Tabl. geny spojené s cytoskeletem obsahující intron  
(SGD, Ares lab Yeast Intron Database; Parenteau *et al.*, 2008)



## 2.4. *TUB1* a *TUB3*

Kvasinky *S. cerevisiae* obsahují dva geny pro tubulin  $\alpha$ , *TUB1* a *TUB3*. Oba geny se nachází na chromozómu 13. Oba geny jsou vysoce homologní. Porovnáním sekvencí je možné zjistit, že se *TUB1* a *TUB3* od sebe liší jen asi v 19% nukleotidů. Rozdíl v aminokyselinové sekvenci Tub1 (447 aa) a Tub3 (445) je ještě menší a představuje přibližně 10% (Schatz *et al.*, 1986a).

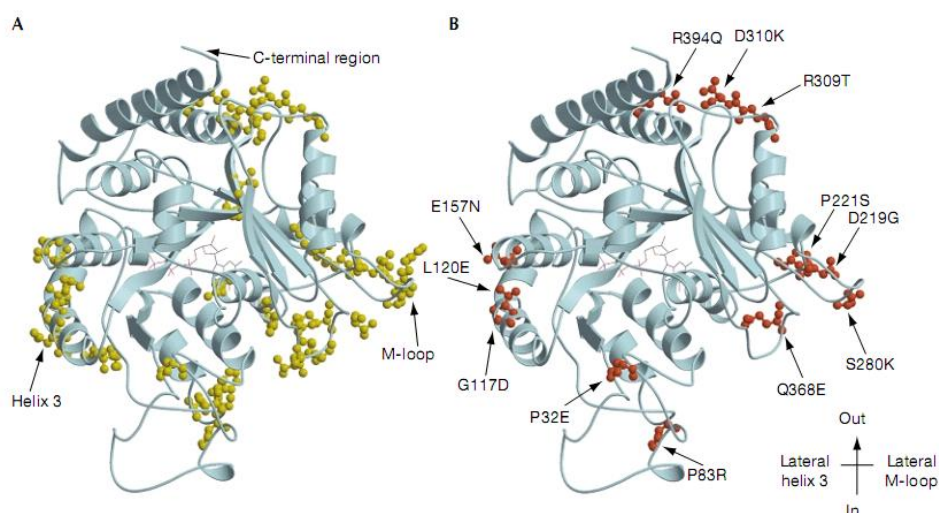
Každý z těchto dvou genů obsahuje jeden intron lokalizovaný do devátého kodonu otevřeného čtecího rámce. *TUB1* obsahuje relativně krátký intron o délce 115 nukleotidů. *TUB3* intron je dlouhý 298 nukleotidů s neobvykle velkou vzdáleností mezi místem větvení (BS) a 3' sestřihovým místem 139 nukleotidů, průměrná vzdálenost je 36-43 nt (SGD, Ares lab Yeast Intron Database).

Nebylo zjištěno, že by sestřih intronů genů *TUB1* a *TUB3* podléhal regulaci, tyto introny jsou kompletně sestřihovány i v komplexním médiu (Juneau *et al.*, 2007). Delece intronu *TUB1* nebo *TUB3* nemá vliv na dělení buněk ani na strukturu mikrotubulů. U kmenů s delecí těchto intronů také nebyly pozorovány změny v hladině mRNA ani v množství tubulinu  $\alpha$  v buňce (Parenteau *et al.*, 2008).

Gen *TUB1* je esenciální, *TUB3* esenciální není. Delece genu *TUB3* způsobí zvýšení citlivosti buněk na mikrotubulární inhibitor benomyl a snížení viability spór. Delece *TUB1* genu je letální, ale jeho absenci je možné nahradit přidáním další kopie genu *TUB3*, a to buď přímo do genomu nebo na centromerickém plasmidu. Zvýšení množství tubulinu  $\alpha$  v buňkách například pomocí další kopie genu *TUB1* nebo *TUB3* vede ke zvýšení rezistence buněk k benomylu (Schatz *et al.*, 1986b). Bylo také zjištěno, že buňky tolerují relativně vysokou nadprodukcí Tub1 i Tub3. Nebyl zjištěn žádný projev ani při třicetinasobné nadprodukcí těchto proteinů (Weinstein and Solomon, 1990).

Tubulin  $\alpha$  kódovaný geny *TUB1* a *TUB3* tvoří heterodimery s tubulinem  $\beta$  kódovaným genem *TUB2* (Neff *et al.*, 1983). Dimery polymerují do mikrotubulů, které se v buňce podílí na celé řadě procesů při mitoze i meioze: segregace chromozomů, orientace vřeténka a migrace jádra (shrnutí ve Winsor and Schiebel, 1997).

In vitro bylo zjištěno, že mikrotubuly složené z Tub1 jako jediného tubulinu  $\alpha$  jsou více dynamické než mikrotubuly divokého typu a naopak u mikrotubulů složených pouze z Tub3 jako tubulinu  $\alpha$  je možné pozorovat výrazné snížení dynamiky (Bode *et al.*, 2003). Tub1 a Tub3 se liší pouze v 39 aminokyselinových zbytcích, velká část z těchto záměn se nachází na povrchu tubulinu  $\alpha$  a několik záměn se nachází i v místech interakce dimerů a může tak ovlivnit skládání mikrotubulů. U jedenácti rozdílných aminokyselinových zbytků dochází ke změně náboje v daném místě a tři záměny aminokyselin tvoří prolin. Tyto změny mohou výrazně ovlivnit interakci mezi protofilamenty, a v důsledku rovněž stabilitu mikrotubulů (Bode *et al.*, 2003; Obr. 6).



Obr. 6 Místa v Tub1 která se liší od těch v Tub3 jsou lokalizovaná především na povrchu tubulinu  $\alpha$ .

Pohled od mínus konce mikrotubulu. A: Postranní řetězce 39 aminokyselin, které se liší jsou znázorněny žlutě. B: Postranní řetězce 12 aminokyselin, kde dochází ke změně náboje nebo je změněn prolin jsou znázorněny červeně. C-terminální region není zahrnut do tohoto modelu (převzato z Bode *et al.*, 2003).

#### 2.4.1. Vztah buněčného cyklu a sestřihu pre-mRNA *TUB1* a *TUB3*

Sestřih pre-mRNA a regulace buněčného cyklu jsou dva oddělené procesy. Přesto bylo v kvasinkách *S. cerevisiae* nalezeno mnoho genů, které hrají důležitou roli v sestřihu pre-mRNA i v průchodu buněk mitotickým cyklem. Mezi geny sestřihových faktorů, jejichž mutace nebo delece způsobí zastavení buněčného cyklu patří: *PRP3*, *PRP8*, *PRP16*, *PRP17*, *PRP19*, *PRP22*, *SLU7*, *CEF1*, *ISY1*, *SYF1*, *SYF2* *CLF1* (Vijayraghavan *et al.*, 1989; Shea *et al.*, 1994; Lundgren *et al.*, 1996; Ben Yehuda *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000; Biggins *et al.*, 2001; Burns *et al.*, 2002; Dahan and Kupiec, 2002). Mutace nebo delece těchto genů vedou i k dalším shodným projevům než jen k zastavení buněčného cyklu (zpravidla v G2/M). Mutace *prp17-1*, *cef1-13* a dvojitý mutant *isy1Δ syf2Δ* se projevují zvýšenou citlivostí k mikrotubulárním inhibitorům jako jsou benomyl a nocodazol: (Burns *et al.*, 2002; Dahan and Kupiec, 2002; Chawla *et al.*, 2003). Buňky s mutací *prp8-101*, *prp17-1*, *prp17Δ*, *prp16-2*, *prp22-1* a *isy1Δ syf2Δ* mají poškozený sestřih intronů *TUB1* a *TUB3* genů projevující se poklesem hladiny jejich mRNA. (Umen and Guthrie, 1995; Dahan and Kupiec, 2002; Chawla *et al.*, 2003). U mnoha těchto mutantů bylo ale především zjištěno, že delece intronu z genu *TUB1* nebo exprese cDNA *TUB1* nebo *TUB3* může zcela nebo zčásti reparovat poškození způsobené touto mutací (Biggins *et al.*, 2001; Burns *et al.*, 2002; Dahan and Kupiec, 2002; Chawla *et al.*, 2003). Z uvedených informací je tak možné usuzovat, že poškozený sestřih intronů genů *TUB1* a *TUB3* může z části vysvětlit u mnoha mutací v sestřihových faktorech, proč dochází k zastavení buněčného cyklu v G2/M přechodu tj. ve fázi s nesegregovanými chromozomy.

## 2.5. ACT1 a COF1

V kvasince *S. cerevisiae* se vyskytuje pouze jeden esenciální gen pro aktin *ACT1* (Gallwitz and Seidel, 1980; Ng and Abelson, 1980). Aktin (375 aa) je ATP vážící protein, který se v buňkách vyskytuje ve dvou formách: jako G-aktin (monomer) a jako F-aktin (filamenta; shrnuto v Winsor and Schiebel, 1997). Aktinová filamenta vznikají reverzibilní polymerací monomerů a představují tak vysoce dynamické struktury schopné růstu na obou koncích. Rychleji rostoucí konec se nazývá plus konec (barbed end), druhý, pomaleji rostoucí konec, je mínus konec (pointed end). Dynamiku mikrofilament ovlivňuje mnoho různých aktin vázajících proteinů (actin-binding proteins ABPs), mezi které patří i protein cofilin.

Aktin váže nukleosidfosfát a funguje jako ATPáza. Aktinové monomery z cytosolu nesoucí ATP se mohou přidávat na rostoucí konec mikrofilamenta. Krátce po zapojení monomeru do vlákna dochází k hydrolýze ATP na ADP, která snižuje sílu vazby mezi aktinovými monomery ve filamentu. Hydrolýza tak usnadňuje depolymeraci vláken, a je tudíž důležitá pro dynamiku mikrofilament. Výměna ADP za ATP není možná, dokud je aktin vázán ve vlákne. K výměně dochází až v cytosolu po oddělení monomeru od filamenta.

Kvasinková buňka obsahuje tři hlavní typy aktinových struktur, „actin cytoplasmatic cables“, „actin-myosin contractile ring“ a „actin cortical patches“. „Actin cytoplasmatic cables“ se skládají z podélných svazků aktinových mikrofilament. „Cortical patches“, fungující jako kotvící struktury, obsahují aktinová mikrofilamenta a invaginovanou membránu (shrnutí v Schott *et al.*, 2002).

Gen *COF1* kóduje esenciální protein cofilin (143 aa; Iida *et al.*, 1993) vyskytující se především v oblasti „cortical patches“. Cofilin má schopnost vázat s vysokou afinitou podjednotky aktinu v mikrofilamentech, u kterých došlo k hydrolýze ATP na ADP. Cofilin se tak váže především na mínus konec filament, ale je schopen vázat i aktinové monomery (G-aktin). Vazba cofilinu na aktinové mikrofilamentum vede k zakřivení této struktury, což usnadní vazbu dalších proteinů. Následně dochází k odštěpení kousku filamenta, a tím ke vzniku většího počtu mínus konců, což vede ke zvýšenému odbourávání filament. Cofilin se tak výrazně podílí na zvýšení dynamiky aktinového cytoskeletu (Moon *et al.*, 1993; Moon and Drubin, 1995).

Gen *COF1* obsahuje intron 179 nukleotidů dlouhý. Vzdálenost mezi místem větvení branch point BS) a 3' sestřihovým místem dosahuje délky 133 nukleotidů, což je vzdálenost u kvasinek *S. cerevisiae* nezvyklá (SGD; Ares lab Yeast Intron Database).

Gen *ACT1* také obsahuje jeden intron, který má délku 308 nukleotidů (SGD, Ares lab Yeast Intron Database). Intron genu *ACT1* je nejpoužívanějším modelovým intronem pro sestřih in vitro. Bylo tudíž nalezeno mnoho mutací v tomto intronu, které zhoršují sestřih buď přímo nebo za suboptimálních podmínek. Například záměna prvního nukleotidu intronu G na 5'sestřihovém místě za A blokuje druhý krok sestřihu a velice výrazně snižuje produkci mRNA (Vijayraghavan *et al.*, 1989). Jiné mutace v tomto intronu naopak mohou defekt sestřihu způsobený touto mutací částečně potlačit (Kivens and Siliciano, 1996).

Genomová delece celého intronu z genu *ACT1* byla připravena ve dvou odlišných studiích. V první práci nepozorovali autoři u buněk nesoucích delecí *act1Δi* žádný defekt v růstu na komplexním médiu. Zjistili ale, že tyto kvasinky jsou více citlivé na přítomnost inhibitoru latrunculinu v médiu. Latrunculin je látka způsobující depolymeraci aktinových mikrofilament. Dále u těchto buněk pozorovali snížení hladiny mRNA *ACT1* až na 73% této mRNA v buňkách s intronem v *ACT1* genu (Juneau *et al.*, 2006). V jiné studii, také vytvořili buňky s mutací *act1Δi*, ale pravděpodobně s jiným genetickým pozadím. U těchto buněk bylo pozorováno, že delece intronu *ACT1* genu nezpůsobuje žádnou změnu v hladině mRNA ani v množství proteinu. Také nebyl nalezen žádný vliv této delece na růst buněk v komplexním médiu ani nebyla zhoršena schopnost kompetice mutantních buněk s buňkami divokého typu ve stejné kultuře (Parenteau *et al.*, 2008).

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Seznam použitých organismů

##### *Escherichia coli:*

kmen	genotyp
<b>DH5a</b>	$\phi 80dlacZ\Delta M15$ <i>recA</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>deoR\Delta</i> ( <i>lacZYA-argF</i> )U169

##### *Saccharomyces cerevisiae:*

kmen	genotyp
<b>EGY48</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3</i> <i>his3</i> <i>trp1</i> <i>LexA(6xop)-LEU2</i>
<b>KAY02</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3</i> <i>his3</i> <i>trp1</i> <i>LexA(6xop)-LEU2</i> , <i>prp45(1-169)-HA::kanMX6</i>
<b>KGY823</b>	<i>MATa</i> <i>ura3-52</i> <i>lys2-801</i> <i>ade2-101</i> <i>leu2-\Delta 1</i> <i>trp1-\Delta 1</i>
<b>KGY2914</b>	<i>MATa</i> <i>tub1\Delta i</i> <i>ade2-101</i> <i>leu2-\Delta 1</i> <i>lys2-801</i> <i>trp1-\Delta 1</i> <i>ura3-52</i>
<b>TSY01</b>	<i>MATa</i> <i>ura3-52</i> <i>lys2-801</i> <i>ade2-101</i> <i>leu2-\Delta 1</i> <i>trp1-\Delta 1</i> , <i>prp45(1-168)-HA::kanMX6</i>
<b>TSY02</b>	<i>MATa</i> <i>tub1\Delta i</i> <i>ade2-101</i> <i>leu2-\Delta 1</i> <i>lys2-801</i> <i>trp1-\Delta 1</i> <i>ura3-52</i> , <i>prp45(1-169)-HA::kanMX6</i>
<b>JPY10H2</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i>
<b>JPY12G9</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>cof1\Delta i</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i>
<b>AVY45</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i> , <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6</i>
<b>JKY03</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>cof1\Delta i</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i> , <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6</i>
<b>JPY10H3</b>	<i>MATa</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i>
<b>JPY11D4</b>	<i>MATa</i> <i>tub3\Delta i</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i>
<b>AVY19</b>	<i>MATa</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i> , <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6</i>
<b>JKY02</b>	<i>MATa</i> <i>tub3\Delta i</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>his3\Delta 200</i> , <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6</i>
<b>JPY10H7</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>ade2\Delta::hisG</i>
<b>JPY12F8</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>tub1\Delta i</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>ade2\Delta::hisG</i>
<b>AVY47</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>ade2\Delta::hisG</i> , <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6</i>
<b>JKY01</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>tub1\Delta i</i> <i>ura3\Delta 0</i> <i>leu2\Delta 0</i> <i>lys2\Delta 0</i> <i>ade2\Delta::hisG</i> , <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6</i>

### 3.1.2. *Kultivační média a roztoky*

#### **Kultivace bakteriálních kmenů:**

- 1× LB**      Universalpepton M66 (MERCK, BRD): 10 g/l  
Yeast Extract (Formedium LTD, UK): 5 g/l  
NaCl (Penta, ČR): 5 g/l
- 2× LB (Super LB)**      Universalpepton M66 (MERCK, BRD): 20 g/l  
Yeast Extract (Formedium LTD, UK): 10 g/l  
NaCl (Penta, ČR): 5 g/l
- ŽA2**      4% živný agar č.2 (Imuna,SR)

V případě potřeby přidávat selekční antibiotika (1000× koncentrované zásobní roztoky, přidávat do médií vychladlých na cca 55°C) **Ampicilin** (Biotika, SR): výsledná koncentrace 100 µg/ml.

Média připravovat do vody upravené v přístroji Watrex filtry Rovapur 100 a Ultrapur (dále ddH<sub>2</sub>O) a sterilizovat v autoklávu 20 min, 121°C.

#### **Kultivace kvasinkových kmenů:**

- YPAD**      Universalpepton M66 (MERCK, BRD): 20 g/l  
Yeast Extract (Formedium LTD, UK): 10 g/l  
Adenin-hemisulfát (Sigma, USA): 100 mg/l  
(Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK): 20 g/l

Rozpustit do 225 ml ddH<sub>2</sub>O. Sterilizovat v autoklávu 20 min, 121°C. Po klávování přidat 25 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a do média zchladlého na cca 55°C přidat ampicilin a výslednou koncentraci 100 µg/ml.

**SD médium** Yeast nitrogen base without amino acids (zdroj dusíku, vitamíny, základní a kovové ionty; Difco<sup>TM</sup>, USA): 6,7 g/l  
Synthetic complete, SC-HIS, -LEU, -TRP, -URA (směs aminokyselin a bází vyjma uvedených; Formedium LTD., UK): 1,394 g/l  
(Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK): 20 g/l

Rozpustit do 225 ml ddH<sub>2</sub>O. Po vyklávkování přidat dle požadované selekce 2,5 ml roztoku aminokyselin a bází (viz. níže). Přidat 25 ml 20% glukózy a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

#### **Roztoky aminokyselin a uracilu:**

(100× koncentrované zásobní roztoky)

L-Histidin HCl monohydrát (Sigma, USA): 2 g/l

L-Leucin (Sigma, USA): 10 g/l

L-Tryptofan (Sigma, USA): 2 g/l

L-Uracil (Sigma, USA): 2 g/l

#### **Obecně používané roztoky:**

**10 × TE pufr** 0,1 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

pH upravit pomocí HCl na požadovanou hodnotu

**vzorkový pufr** 0,06 % bromfenolová modř, 60 % glycerol, 60 mM EDTA

**2 × Laemmli pufr:** 0,112 M Tris-HCl, pH 6,8;

3,42 % SDS

12%(v/v) glycerol

0,002% bromfenolová modř



### 3.1.3. *Přehled použitých DNA modifikujících enzymů*

#### **Defosforylace konců DNA:**

**Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)** (#EF0511; MBI Fermentas, Litva): 1 U/μl  
100% aktivní ve všech pufrch pro restrikční endonukleázy

#### **Ligace DNA:**

**T4 DNA ligáza** (#EL0015; MBI Fermentas, Litva): 1 U/μl  
10× reakční pufr (#B69; MBI Fermentas, Litva): 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8 při 25°C

#### **Amplifikace DNA pomocí PCR:**

**Taq DNA polymeráza** rekombinantní (#EP0402; MBI Fermentas, Litva): 5 U/μl  
10× reakční pufr s KCl: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40, pH 8,8 při 25°C

#### **Štěpení DNA restrikčními endonukleázami:**

enzym	výrobce
<b>ApaI</b> (#ER1411)	MBI Fermentas
<b>PstI</b> (#ER0611)	MBI Fermentas
<b>SacI</b> (#ER1131)	MBI Fermentas
<b>XhoI</b> (#ER0691)	MBI Fermentas

Reakční pufr pro štěpení dvěma různými enzymy byl zvolen podle doporučení výrobce: (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>).

### 3.1.4. *Kity pro izolaci a manipulaci nukleových kyselin*

#### **Izolace plasmidové DNA:**

NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (Macherey-Nagel)

#### **Izolace fragmentů DNA z gelu:**

NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey–Nagel)

**Izolace RNA:**

Master Pure™ Yeast RNA purification Kit (EPICENTRE® Biotechnologies)

**Reverzní transkripce:**

RevertAid RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas)

**qPCR:**

iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)

**3.1.5. Použité protilátky**

**anti HA.11:** myší monoklonální IgG1 proti hemaglutininovému epitopu, klon 16B12, Covance; doporučené ředění 1:1000

**GAM-AP:** sekundární protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP); Promega, USA; doporučené ředění 1:4000

**3.1.6. Seznam primerů****Primery pro detekci WT *PRP45*:**

primer	sekvence
<b>KM02</b>	GCTGAATTCATGCTATCGGTTCCCTTGCC
<b>PL03</b>	GAAGTCGAGCTAAAGAGCTTTACCTACAC

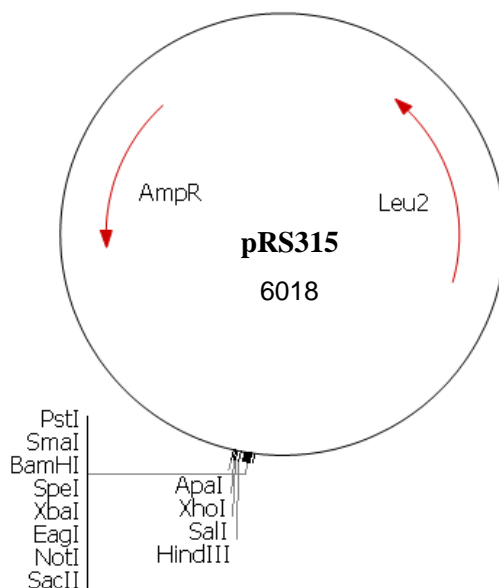
**Primery pro přípravu integrační kazety pro vytvoření kmenů *prp45*(1-169):**

primer	sekvence
<b>KM09</b>	GGAGAAGCTGATCCAAATGAGTGGAAGATACCTGCAGCTGTGCGGATCCCC GGGTTAATTAA
<b>KM10</b>	CAAGCACAAGAATGCTTTGTTTTCTAGTGCTCATCCTGGGCGAATTCGAGC TCGTTTAAAC

### Primery pro detekci RNA metodou qPCR:

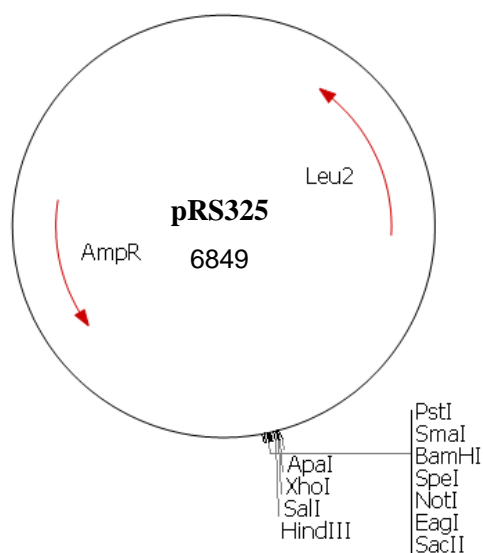
primer	sekvence	detekce
<b>OG71</b>	CGACGTTGTCGATGATGAAG	TOM22, F
<b>OG72</b>	GCAACGATTCTGTCCAAC	TOM22, R
<b>OG75</b>	CTAACAAAAGAAGATGTCTAGATCTGGTG	COF1, sestřižená mRNA F
<b>OG76</b>	GGTTTTAGCATCGTTCAATCCG	COF1, sestřižená mRNA R
<b>OG77</b>	CTGATGAATCCCTTACCGCTTTC	COF1, celková RNA F
<b>OG78</b>	CATCGTAAGATGGGTCAGTAGAGG	COF1, celková RNA R
<b>OG79</b>	AATTTACTGAATTAACAATGGATTCTGAGG	ACT1, sestřižená mRNA F
<b>OG80</b>	GATAGATGGGAAGACAGCACG	ACT1, sestřižená mRNA R
<b>OG81</b>	GATGGTGTTACTCACGTCGTTTC	ACT1, celková RNA F
<b>OG82</b>	GTAGTCAGTCAAATCTCTACCGGC	ACT1, celková RNA R
<b>OG104</b>	GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGTTG	TUB3, sestřižená mRNA F
<b>OG105</b>	CCTCCAAATGGCCGTCTTC	TUB3, sestřižená mRNA R
<b>OG106</b>	CTAGAGCATGGCATCAAGGAA	TUB3, celková RNA F
<b>OG107</b>	CCCCGTTTCATGGAAGAATGTA	TUB3, celková RNA R
<b>OG115</b>	AGAGAAGTTATTAGTATTAATGTC	TUB1, sestřižená mRNA F
<b>OG116</b>	TCTTCTAGATGTCCATCC	TUB1, sestřižená mRNA R
<b>OG117</b>	GAGCACGGTATTAAGC	TUB1, celková RNA F
<b>OG118</b>	GGAAAAACGTGGAGAAA	TUB1, celková RNA R
<b>OG119</b>	GTATGTTTCGATTTGCCC	TUB1, intron (před BS) F
<b>OG120</b>	GCGTTGAAGTTAGTAATG	TUB1, intron (přes BS) R
<b>OG121</b>	GTACCAGCACAGTTTAC	TUB3, intron (před BS) F
<b>OG122</b>	ATCCTCCGAAGAAGAAG	TUB3, intron (za BS) R
<b>OG133</b>	CTCGCTCTCTTATGTCCCTTTC	COF1, intron (za BS) F
<b>OG134</b>	CTACACAGAACTTCACATT	COF1, intron (za BS) R
<b>OG135</b>	GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGGTA	TUB3, pre-mRNA (exon I/intron) F
<b>OG136</b>	GAATGAATCAAACCAGATCAGATCAAAC	TUB3, pre-mRNA R (intron)
<b>OG137</b>	TGGGCATACTCGGACGAAA	TUB3, intron (za BS) F
<b>OG138</b>	GCAATCCTCCGAAGAAGAAGAC	TUB3, intron (za BS) down R
<b>OG139</b>	AAACAATGAGAGAAGTTATTAGTATTAATGGTA	TUB1, pre-mRNA (exon I/intron) F
<b>OG140</b>	TTGCGTTGAAGTTAGTAATGAAAGATG	TUB1, pre-mRNA (intron) R
<b>OG141</b>	ACAAAAGAAGATGTCTAGATCTGGGTA	COF1, pre-mRNA (exon I/intron) F
<b>OG142</b>	GTTCCATGTTAAAAAGGGAGGAAAGA	COF1, pre-mRNA (intron) R
<b>OG143</b>	TCGTGATAAGTGATAGTGATATTC	ACT1, intron (před BS) F
<b>OG144</b>	AGAATGAAGCAATCGATGTTAGT	ACT1, intron (za BS) R
<b>OG145</b>	AATTTACTGAATTAACAATGGATTCTGGTA	ACT1, pre-mRNA (exon I/intron) F
<b>OG146</b>	AGGTTATGGGAGAGTGAAAAATAGTA	ACT1, pre-mRNA (intron) R

### 3.1.7. Použité vektory a plasmidy



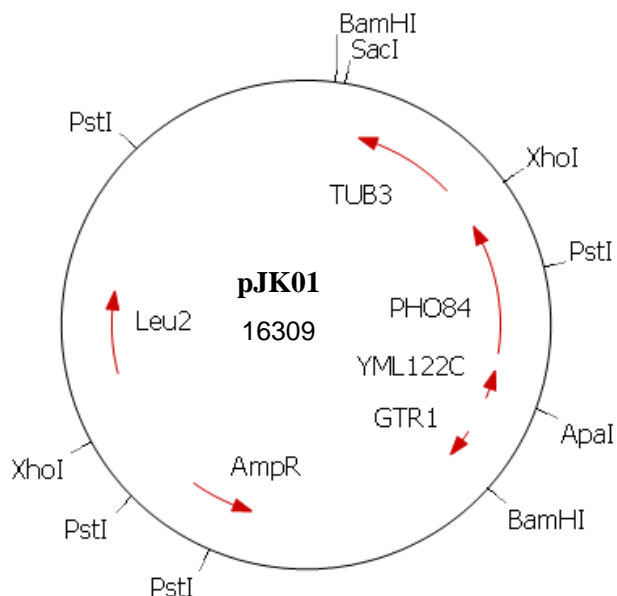
Obr. 1 Vektor pRS315 (6 018 bp).

Vyznačena některá unikátní restrikční místa gen pro rezistenci k ampicilinu a gen Leu2 pro kvasinkovou selekci. Sekvence centromery se nachází v oblasti mezi geny AmpR a Leu2 (Sikorski and Hieter, 1989).



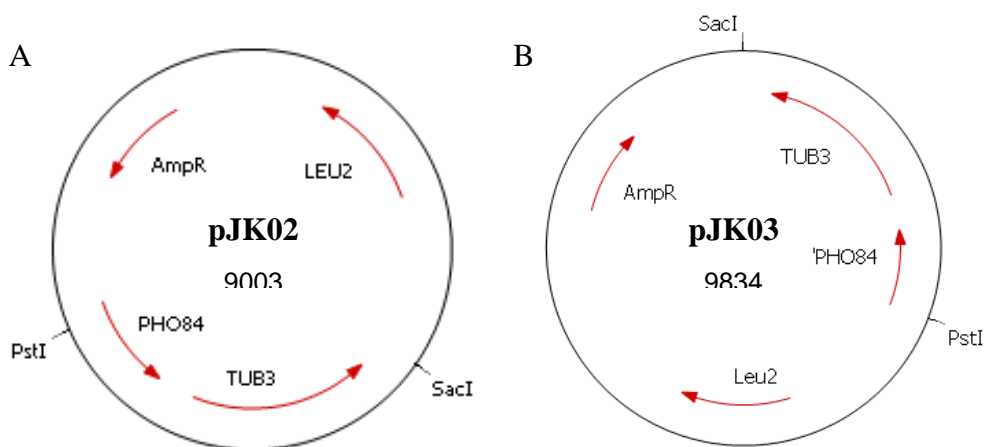
Obr. 2 Vektor pRS325 (6 849 bp).

Vyznačena některá unikátní restrikční místa. Sekvence 2 $\mu$  ARS se nachází v oblasti mezi geny AmpR a Leu2 (Sikorski and Hieter, 1989).



Obr. 3 Plasmid pJK01 (16 309 bp).

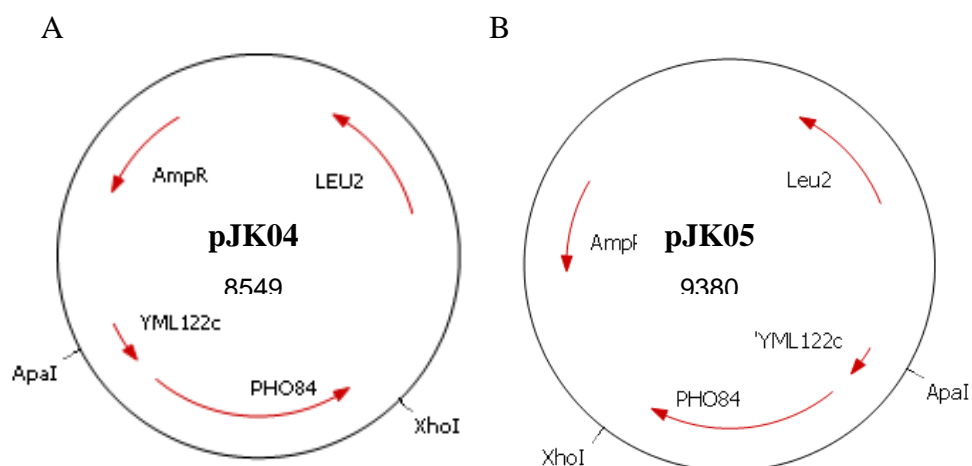
Vyznačena některá restrikční místa. Replikativní plasmid z genomové knihovny ve vektoru YEp13 (Reed *et al.*, 1989) s inzertem genomové DNA vložené do Yep13 vektoru pomocí BamHI restrikčního místa.



Plasmidy pJK02 (9 003 bp) a plasmid pJK03 (9 834).

A: pJK02 je centromerický plasmid (sekvence centromery se nachází v oblasti mezi geny AmpR a Leu2) odvozený od vektoru pRS315 vložením fragmentu inzertu z pJK01 plasmidu pomocí vyznačených unikátních restrikčních míst PstI a SacI.

B: pJK03 je replikativní plasmid (sekvence 2 $\mu$  ARS se nachází v oblasti mezi geny AmpR a Leu2) odvozený od vektoru pRS325 vložením stejného inzertu jako pJK02.



Plasmidy pJK04 (8 549 bp) a plasmid pJK05 (9 380).

A: pJK04 je centromerický plasmid odvozený od vektoru pRS315 vložení fragmentu inzertu z pJK01 plasmidu pomocí vyznačených unikátních restričních míst ApaI a XhoI.

B: pJK05 je replikativní plazmid odvozený od vektoru pRS325 vložení stejného inzertu jako pJK04.

#### Přehled použitých vektorů a plasmidů:

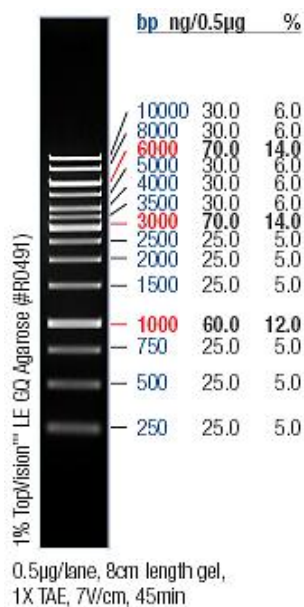
plasmid/vektor	vložené geny	typ
YEp13/YEp13-lib.	genomová knihovna	2μ
pJK01	YML122c, PHO84, TUB3 a fragment GTR1	2μ
pJK02	TUB3	cen.
pJK03	TUB3	2μ
pJK04	PHO84	cen.
pJK05	PHO84	2μ
pRS315	-	cen.
pRS325	-	2μ

### 3.1.8. Standardy velikostí a množství

#### DNA:

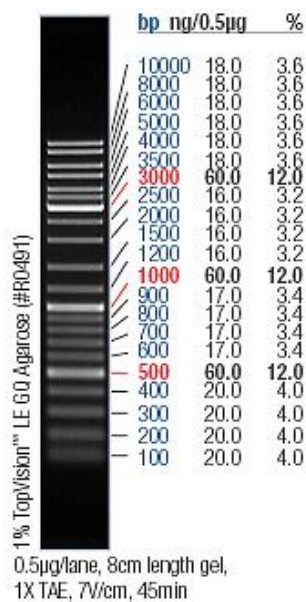
##### GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

(MBI Fermentas)



##### GeneRuler™ DNA Ladder Mix

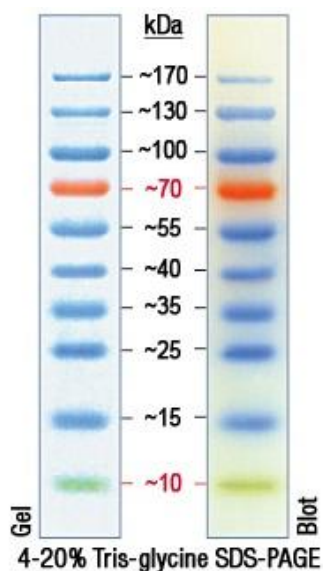
(MBI Fermentas)



#### Proteiny:

##### PageRuler™ Prestained Protein Ladder

(MBI Fermentas)



## **3.2. Metody**

### **3.2.1. Glycerolové konzervy *S. cerevisiae***

#### **Příprava:**

K 500 µl suspenze kvasinek v deionizované vodě přidat 500 µl 60% sterilního pufrovaného glycerolu (60% (v/v) glycerol; Sigma). Za občasného promíchání překlápěním inkubovat 30 min při pokojové teplotě. Přenést do –80°C a tamtéž uchovávat.

#### **Výsev:**

Seškrábnout sterilním párátkem vrchní vrstvu zmrzlých buněk a nanést na plotnu s komplexním médiem.

### **3.2.2. Izolace plasmidové DNA**

#### ***E.-coli*, alkalické metoda:**

(dle Birnboim and Doly, 1979; upraveno)

- Zaočkovat na plotnu s ŽA2 obsahující selekční antibiotikum ampicilin 100 µg/ml bakteriální klon *E. coli* nesoucí příslušný plasmid. Kultivovat přes noc při 37 °C.
- Zaočkovat monoklonií 20 ml LB média s 100 µg/ml ampicilinu v 250 ml Erlenmayerově baňce. Kultivovat v třepačce přes noc, tj. asi 16 hodin (37°C, 200 rpm).
- Ochladit kulturu v ledové lázni (10 min), přelít do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, 2800 g, 20 min, 4°C).
- Sediment dokonale resuspendovat do 2 ml ledově vychlazeného roztoku I (25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA - NaOH, 1% glukóza)
- Zkumavku vyjmout z ledové lázně, přidat 4 ml roztoku II (1% SDS, 0,2 M NaOH), jemně promíchat nechat 5 minut působit detergent.



- Zkumavku přenést zpět do ledové lázně a přidat 3 ml ledově vychlazeného roztoku III (3 M octan draselný, 2 M kyselina octová, pH 5,4), lehce promíchat otáčením zkumavky a inkubovat 30 minut na ledu.
- Směs převést do polypropylénových centrifugačních zkumavek a bílou sraženinu usadit centrifugací (Jouan MR22i; 17000 g, 20 min, 4°C).
- Supernatant převést do centrifugační zkumavky a v poměru 5:3 smísit s ledově vychlazeným izopropanolem, ihned centrifugovat (Jouan MR 22i; 2800 g, 5 minut).
- Supernatant slít, sediment nechat oschnout, rozpustit v 300 µl deionizované vody a převést do mikrozukavky.
- Přidat stejný objem 10 M LiCl a inkubovat 45 min při -20°C a 10 min při -80°C. Vzniklou sraženinu usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 5 minut), supernatant převést do nové mikrozukavky.
- Plasmidovou DNA vysrážet z roztoku jedním objemem 96% ethanolu (45 min při -20°C a 10 min při -80°C).
- Sraženinu DNA usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 5 minut), supernatant slít, sediment opláchnout 1 ml 70% ethanolu, opět centrifugovat, supernatant odstranit a sediment mírně vysušit.
- Rozpustit v 100 µl deionizované vody.
- Množství plasmidové DNA ověřit elektroforeticky.

### ***E.-coli*, kit:**

NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)

- Ve 2 ml mikrozukavce s perforovaným víčkem kultivovat (Termomixer eppendorf; 900rpm, 40°C) klon *E. coli* s daným plasmidem v 1,5 ml 2×LB přes noc.
- Dále postupovat podle návodu přiloženého k dané soupravě výrobcem (Silica-membrane technology, přečištěná plasmidová DNA na konci vymyta do 50 µl AE pufru - 5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

### ***S. cerevisiae*, izolace pomocí skleněných kuliček a kitu:**

- Jednou kvasinkovou monokolonií zaočkovat 5 ml příslušného selekčního média a inkubovat na třepačce nejméně 20 hod při 30°C (200 rpm).
- Suspenzi centrifugovat (Jouan MR 22i, 3 minut, 1000 g). Supernatant slít, sediment resuspendovat v reziduální tekutině.
- Do mikrozkušavky s 0,3 g předem omytých skleněných kuliček (425-600 µm, Sigma, USA) převést resuspendovaný sediment, přidat 0,2 ml roztoku yeast lysis solution (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA) a dále přidat 0,2 ml směsi pufrovaný fenol : chloroform : isoamylalkohol v poměru 25:24:1.
- Intenzivně vortexovat 2 min a poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 5 min).
- Svrchní vodnou fázi převést do nové 1,5 ml mikrozkušavky.
- Pro další přečištění suspenze použít kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), postupovat podle návodu přiloženého k dané soupravě výrobcem (Silica-membrane technology, přečištěná plasmidová DNA na konci vymyta do 50 µl AE pufru - 5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

### ***3.2.3. Izolace plasmidové DNA z S. cerevisiae***

- Zaočkovat 20 ml 2× YPAD kvasinkami a inkubovat na třepačce nejméně 20 hod při 30°C (200 rpm). Centrifugovat (Jouan MR 22i, 3 minut, 1000 g). Supernatant slít, sediment resuspendovat v reziduální tekutině a převést do mikrozkušavky, centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 10 sekund). Supernatant slít, sediment resuspendovat ve zbylé kapalině.
- Do mikrozkušavky s 0,3 g předem omytých skleněných kuliček (425-600 µm, Sigma, USA) převést resuspendovaný sediment, přidat 0,2 ml roztoku yeast lysis solution (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA) a dále přidat 0,2 ml směsi pufrovaný fenol : chloroform : isoamylalkohol v poměru 25:24:1.
- Intenzivně vortexovat 3 min a poté přidat 0,2 ml TE pufru (pH = 8). Centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 5 min).

- Horní vodnou fázi převést do nové mikrozkušavky a přidat 1 ml 96% ethanolu. Promíchat překlápěním a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 2 min).
- Sediment resuspendovat v 0,4 ml TE pufru a přidat 1  $\mu$ l Rnasy A (10mg/ml). Inkubovat 5 min při 37°C.
- Přidat 10  $\mu$ l 4M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  a 1 ml 96% ethanolu, promíchat překlápěním a inkubovat 1 hod. při -20°C). Centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 2 min), sediment dvakrát omýt 70% ethanolem a resuspendovat do 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.4. *Transformace*

#### ***E.-coli*, elektroporace:**

Příprava kompetentních buněk:

- Zaočkovat na plotnu s ŽA2 recipientní bakterie. Kultivovat dva dny při 37°C.
- Zaočkovat buňkami z plotny 30 ml LB média v 250 ml Erlenmayerově baňce. Kultivovat v třepačce přes noc, tj. asi 16 hodin (37°C, 200 rpm).
- Kulturou zaočkovat 1 l LB média na OD<sub>600</sub> = 0,05 (4  $\times$  250 ml média ve dvou 2 l Erlenmayerových baňkách) a inkubovat na třepačce (200 rpm, 37°C) dokud nedosáhne OD<sub>600</sub> = 0,6.
- Baňky přenést do ledové lázně a nechat zde vychladit 10 min (celý další postup na ledu).
- Kulturu přelit do dvou vychlazených 250 ml plastových centrifugačních zkumavek (Nalgene, USA) a buňky sedimentovat centrifugací (Janetzki K26, 3500 g, 10 min).
- Supernatant odsát, sediment resuspendovat v 10 ml ledové deionizované vody a převést do 50 ml centrifugační zkumavky, poté vodou doplnit na objem 40 ml. Centrifugovat (Jouan MR 22i, 2800 g, 20 min, 4°C), resuspendovat a doplnit vychlazenou vodou na objem 40 ml a opětovně centrifugovat.

- Sedimenty resuspendovat v 1 ml 10% (w/w) ledového glycerolu, poté suspenze spojit do dvou zkumavek, doplnit glycerolem na 25 ml a centrifugovat (Jouan MR 22i, 2800 g, 20 min, 0°C). Promýtit glycerolem zopakovat.
- Sedimenty resuspendovat ve zbytkovém objemu supernatantu. Suspenzi rozdělit po 100 - 200  $\mu$ l do 1,5 ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku. Zkušavky ihned zamrazit v tekutém dusíku. Dlouhodobě skladovat při -80°C.

#### Vlastní transformace plasmidové DNA:

- Na dno vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety (BIO-RAD, USA) dát na ledu 40  $\mu$ l elektrokompetentních buněk a 1  $\mu$ l roztoku plasmidové DNA (nebo 3  $\mu$ l ligační směsi).
- Na generátoru pulzu přístroje Gene Pulser Apparatus (BIO-RAD, USA) nastavit hodnoty kapacitance 25  $\mu$ F, napětí 2,5 kV a odpor 200  $\Omega$ . Po vložení kyvety do přístroje aplikovat puls. Výsledná časová konstanta by měla být v rozmezí 4 - 5 milisekund.
- Obsah kyvety okamžitě resuspendovat do 1 ml LB média s 0,5 % glukózy a převést do skleněné zkumavky. Zkušavku s kulturou inkubovat 60 min na třepačce (37°C, 180 rpm).
- Na plotny s ŽA2 agarem obsahující příslušné selekční antibiotikum vysít 200  $\mu$ l kultury (při transformaci směsi po ligaci vysít vše), nechat oschnout a plotny inkubovat v termostatu při 37°C přes noc.

#### ***S.cerevisiae*, lithium-acetátová metoda:**

(dle Schiestl and Gietz, 1989; upraveno)

- Zaočkovat kvasinkami 10 ml YPAD média ve 100 ml Erlenmayerově baňce. Kultivovat v třepačce přes noc (30°C, 200 rpm).
- Inokulem zaočkovat 25 ml YPAD média na OD600 = 0,1 a inkubovat na třepačce (200 rpm, 30°C) dokud nedosáhne OD600 = 0,4.

- Narostlou kulturu centrifugovat v 50 ml centrifugační zkumavce (Jouan MR 22i, 3000 g, 5 min, 20°C). Sediment 2× promýt 25 ml deionizované vody. Po každém promytí opět centrifugovat.
- Výsledný sediment resuspendovat v ddH<sub>2</sub>O na finální objem 1 ml.
- Do 1,5 ml mikrozkuvek napipetovat (1 reakce): 100 µl buněčné suspenze, 1-3 µl roztoku plasmidové DNA (podle koncentrace DNA), 240 µl PEG 3350 (sterilní) 50% w/v (Sigma), 36 µl LiAc 1M (pH 7,5; Sigma) a 10 µl ssDNA (salmon sperm DNAm, 10mg/ml, Sigma; čerstvě denaturovaná povařením 5 min).
- Promíchat vortexováním a navodit tepelný šok přenesením do 42°C na 60 min. Vzorek několikrát promíchat otáčením zkumavky.
- Suspenzi centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 1 min) a pipetou odsát supernatant. Buňky resuspendovat do 1 ml H<sub>2</sub>O, opět centrifugovat a supernatant odsát.
- Sediment resuspendovat v 100 µl deionizované vody a suspenzi vysít na misky s příslušným selekčním SD médiem.

### 3.2.5. *Štěpení DNA restrikčními endonukleázami*

V 0,5 ml mikrozkuvce připravit restrikční směs:

- 1/10 výsledného objemu restrikčního pufru (doporučeného výrobcem)
- vzorek DNA v H<sub>2</sub>O (0,1-4 µg DNA)
- deionizovaná voda (doplnit do výsledného objemu)
- enzym/enzymy (1-10 U enzymu/µg DNA v závislosti na struktuře a čistotě vzorku a na doporučení výrobce při štěpení dvěma různými enzymy)

Při optimální teplotě štěpení (doporučené výrobcem) inkubovat 1-4 hod. (nebo přes noc).

### 3.2.6. *Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu*

- Přístroje pro horizontální gelovou elektroforézu
- Pufr 1× TAE (0 mM Tris, 20mM ledová kyselina octová, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,5)
- Agaróza Sea Kem LE Agarose (FMC, USA)
- Vzorky nanášet s 1/5 objemu vzorkového pufru (6× vzorkový pufr: 0,06% bromfenolová modř, 60% glycerol, 60 mM EDTA)
- Dělicí napětí 0,3-10 V/cm
- Gel barvit v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) 10 min. Poté omýt vodou (10 min).
- Fotografovat v procházejícím UV záření s červeným/UV-filtrem (digitální fotoaparát Panasonic Lumix, DMC-F27).

### 3.2.7. *Konstrukce nového plasmidu*

Přenést fragment z jednoho plasmidu do jiného vektoru.

- Štěpení původního plasmidu a vektoru restrikcními endonukleázami – postup viz výše; 50 µl jedno štěpení.
- Defosforylace konců vektorové DNA alkalickou fosfatázou: přidat 1 µl alkalické fosfatázy SAP a inkubovat 60 min při 37°C. Reakci ukončit zahřátím vzorku 15 min, 65°C.
- Elektroforetické oddělení fragmentů – postup viz výše; na gel nanést celý objem 50 µl.
- Izolace fragmentů DNA z gelu: Vyříznout skalpelem oblast gelu s fragmentem DNA. Přenést do mikrozkušavky a zvážit. Dále izolovat pomocí soupravy NucleoSpin® Extract II, postupovat podle návodu přiloženého k dané soupravě výrobcem (Silica-membrane technology). Izolaci ověřit elektroforeticky.

- Ligace DNA: V 0,5ml mikrozkušavce namíchat reakční směs: 2  $\mu$ l (1/10 celkového objemu) ligačního 10  $\times$  pufru, DNA vektoru a inzertu v molárním poměru 1:3 (0,1-10 mM), 0,5  $\mu$ l T4 DNA ligázy a deionizovanou H<sub>2</sub>O doplnit na celkový objem 20  $\mu$ l. Ligační směs inkubovat 2 – 4 hodiny při laboratorní teplotě. Reakci ukončit zahřátím vzorku na 65°C po dobu 15 min.
- Transformace *E. coli* elektroporací – postup viz výše.
- Izolace plasmidové DNA z *E. coli* – postup viz výše.
- Ověření izolace elektroforeticky. Ověření správnosti zaklonování inzertu do nového vektoru pomocí štěpení restrikcními endonukleázami a elektroforézou produktů.

### 3.2.8. *Kapkový test*

- Kvasinkami z čerstvé plotny zaočkovat 10 ml média (YPAD nebo příslušné SD médium pro buňky nesoucí plasmid) ve 100 ml Erlenmayerově baňce, inkubovat na třepačce přes noc (30°C; 200 rpm).
- Přeočkovat kulturu do čerstvého média na OD<sub>600</sub> = 0,1 a nechat růst dvě generační doby.
- Odebrat množství buněk odpovídající 500  $\mu$ l kultury o OD<sub>600</sub> = 0,3 do mikrozkušavky, sedimentovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 1 min), resuspendovat do 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a přepipetovat do první jamky mikrotitrační destičky.
- Do ostatních jamek rozpipetovat 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a přidat vícekanálovou automatickou pipetou 30  $\mu$ l buněčné suspenze z předchozí řady. Takto vytvořit ředění kde v každé řadě jamek je suspenze buněk 3 $\times$  více naředěná než v předchozí řadě.
- Z takto vytvořených ředících řad kapat 5  $\mu$ l na připravené plotny, začít kapat z druhé řady tj ze suspenze o OD  $\approx$  0,1.

### 3.2.9. *Příprava proteinových extraktů S. cerevisiae*

- Zaočkovat 10 ml YPAD média kvasinkami a inkubovat na třepačce přes noc (30°C; 200 rpm).
- Inokulem zaočkovat 15 ml YPAD média na  $OD_{600} = 0,1$  a nechat růst na výslednou  $OD_{600} = 0,3 - 1,0$  (exponenciální fáze).
- Do 15 ml zkumavky odebrat suspenzi odpovídající 10 ml při  $OD = 0,3$ . Centrifugovat (Jouan MR 22i, 3000 g, 20 min, RT).
- Supernatant slít, sediment resuspendovat v 1 ml ddH<sub>2</sub>O, suspenzi převést do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 16000 g, 1 min).
- Supernatant odsát a sediment inkubovat 15 min v -20°C.
- Na ledu k sedimentu přidat 100 µl vychlazeného roztoku (93 µl 2 M NaOH + 7 µl β-merkapt ethanolu), suspenzi intenzivně vortexovat 2 min a inkubovat 10 min na ledu.
- Přidat 100 µl 50% TCA a inkubovat 5 min na ledu. Centrifugovat (Jouan MR 22i, 13000 g, 10 min, 0°C).
- Supernatant odsát, k sedimentu přidat 500 µl 1 M Tris, resuspendovat a znovu centrifugovat (Jouan MR 22i, 13000 g, 1 min, 0°C).
- Supernatant odsát, sediment resuspendovat ve 100 µl 2 × Laemmli pufru s 1/20 objemu 1 M DTT. Suspenzi inkubovat 5 min při 95°C a přenést do -80°C.

### 3.2.10. *Elektroforéza proteinů (PAGE)*

Aparatura: Mini-Protean 3 (Bio-Rad)

Separční gel - 1× 12% gel: 1,75 ml H<sub>2</sub>O, 1,25 ml 4 × Tris·HCl/SDS (pH 8,8),  
2 ml AA/BIS, 3,4 µl TEMED, 16,5 µl 10% (w/v) APS

Zaostřovací gel 1×: 1,6 ml H<sub>2</sub>O, 0,63 ml 4 × Tris·HCl/SDS (pH 6,8), 0,33 ml  
AA/BIS, 3 µl TEMED, 13 µl 10% (w/v) APS



Roztoky: 4 × Tris·HCl/SDS (8,8): 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, 91 g Tris base v 300 ml H<sub>2</sub>O, pH dorovnat 1 N HCl na 8,8 a doplnit H<sub>2</sub>O na 500 ml, přidat 2 g SDS

4 × Tris·HCl/SDS (6,8): 0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, 6,05 g Tris base v 40 ml H<sub>2</sub>O, pH dorovnat na 6,8 a doplnit H<sub>2</sub>O na 100 ml, přidat 0,4 g SDS

AA/BIS: 30 g akrylamidu (Sigma) a 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu (Merck) ve 100 ml H<sub>2</sub>O

10% APS: NH<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

5 × Elektrodoový pufr: 1,51 g Tris (125 mM), 7,2 g glycín (950 mM), 0,5 g SDS (0,5%) na 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 8,3

Vzorky: K proteinovým vzorkům v Laemmli pufru přidat 1/20 objemu 1 M DTT a 5 min inkubovat při 95°C. Do jednotlivých jamek nanést vzorky pomocí mikrodávkače Hamilton.

Rozdělení: konstantní proud; zaostřovací gel – 10 mA/gel, separační gel – 20 mA/gel

### 3.2.11. *Western blot*

- Souprava Mini Trans-Blot (Bio-Rad)
- „Sendvič“: černá blotovací deska, pad (těsnicí porézní vložka, navlhčená v přenosovém pufru), Whatman papír (také navlhčený), gel, nitrocelulosaová membrána, Whatman papír, pad, čirá blotovací deska
- Přenosový pufr: 3,03 g Tris (25 mM), 14,4 g glycín (192 mM), 200 ml methanol (20% v/v) v 1 l H<sub>2</sub>O
- Napětí 100 V (po dobu cca 90 min)
- Membránu s přenesenými proteiny opláchnout v TBS pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl)
- Gel obarvit v Commasie blue:  
60 min v barvicím roztoku (20% methanol; 0,117% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD); 0,051% (v/v) Bismarck Brown R (Sigma); 7% kys. octová v H<sub>2</sub>O)  
Přes noc v odbarvovacím roztoku (20% methanol, 7% kys. octová v H<sub>2</sub>O)

### **3.2.12.      *Imunodetekce proteinů na membráně***

- Blokovat membránu 60 min v 5% odtučněném mléce/0,1%TTBS (orbitální třepačka). TTBS: TBS s 0,05% (0,1%) Tween 20 (Serva)
- Membránu inkubovat přes noc při 4°C (na orbitální třepačce) s primární protilátkou anti HA.11 ředěnou 1:100 v 5% mléce/0,1%TTBS.
- Krátce opláchnout membránu v TTBS a poté odmýt 3 × 10 min v TTBS.
- Inkubovat membránu s konjugátem sekundární protilátky s AP, GAM-AP ředěným 1:4000 v 3% odtučněném mléce/0,05%TTBS po dobu 60 min.
- Krátce opláchnout membránu v TTBS, poté odmýt 4 × 10 min v TTBS a 2 × 5 min v TBS.
- Membránu krátce opláchnout v AP pufru (100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>).
- Položit membránu lícem do vyvíjecího roztoku, ponořit ji a inkubovat ve tmě cca 60 min. Vyvíjecí roztok připravit naředěním zásobních reagensů A a B (BioRad) v AP pufru: Reagent A: 30 mg NBT v 70% DMF; 100 × konc, Reagent B: 15 mg BCIP v H<sub>2</sub>O; 100 × konc.
- Opláchnout deionizovanou vodou a vysušit.

### **3.2.13.      *Amplifikace DNA pomocí PCR***

Reakční směs:

- 1/10 celkového objemu 10 × polymerázový pufr bez MgCl<sub>2</sub>
- 1/10 celkového objemu 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1/10 celkového objemu dNTP - každý 2,5 mM
- 1/10 celkového objemu 10 μM primer 1
- 1/10 celkového objemu 10 μM primer 2
- templát – DNA, cDNA
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu
- přidat Taq DNA polymerázu v množství doporučeném výrobcem (0,5 μl/100 μl směsi)

PCR cykler Peltier PTC-200, MJ Research, USA

### **Detekce přítomnosti WT *PRP45*:**

Templát: Z kolonie odebrat velice malé množství biomasy a resuspendovat ji do ddH<sub>2</sub>O, povařit v cycleru 3 min 95°C, ihned přenést na led

PCR program:

1. 94°C 2:00 min
2. 94°C 0:30
3. 33°C 0:30
4. 72°C 1:00
5. go to 2 3x
6. 94°C 0:30
7. 47°C 0:30
8. 72°C 1:00
9. go to 6 19x
10. 72°C 10:00
11. 10°C 0:30
12. end

### **Amplifikace integrační kazety za účelem tvorby kmene *prp45*(1-169):**

Templát: *Aat*II fragment z plasmidu p30412 (pFA6a-3HA-natMX6) cca 100 ng  
templátové DNA/50 µl celkové reakční směsi

PCR program:

1. 94°C 2:00 min
2. 94°C 0:30
3. 43°C 0:30
4. 68°C 3:00
5. go to 2 9x
6. 94°C 0:30
7. 43°C 0:30
8. 72°C 3:00 + 00:05 each run
9. go to 6 19x
10. 72°C 7:00
11. 15°C 1:00
12. end

### **3.2.14. Izolace RNA**

- Inokulum: 10 ml YPAD média ve 100 ml Erlenmayerově baňce. Kultivovat v třepačce přes noc (30°C, 200 rpm).
- Inokulem zaočkovat 10 ml YPAD média na OD600 = 0,1 a inkubovat (200 rpm, 30°C) dokud nedosáhne OD600 = 0,6–0,8. Odebrat do mikrozkuřavky 1,5 ml buněčné suspenze. (Zamrazit v tekutém dusíku a skladovat při –80°C do doby izolace RNA).
- Izolace RNA Master Pure™ Yeast RNA purification Kit (EPICENTRE® Biotechnologies): Postupovat podle návodu přiloženého k dané soupravě výrobcem. Kit používá „rapid salting-out process“ k odstranění kontaminujících příměsí (Miller et al., 1988; Hoffman a Jarvis, 2004).
- Koncentraci a čistotu izolované RNA ověřit pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### **3.2.15. Reverzní transkripce**

RevertAid RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas), Postupovat podle návodu výrobce. Použít 5 µg RNA izolované z buněk na reakci, pro RT použít jako primery náhodné hexametry („random hexamer“).

### **3.2.16. Quantitative real-time PCR**

#### **Amplifikace DNA a detekce signálu:**

Reakční směs, celkový objem jedné reakce 25µl:

- 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 2× koncentrovaný; obsahuje fluorescenční barvivo SYBR Green I, hot-start iTaq DNA polymerázu, dNTP, pufr (a fluorescein pro well-factor collection).
- 6 µl ddH<sub>2</sub>O
- 0,75 µl každého primeru o koncentraci 10µM
- 5 µl ddH<sub>2</sub>O naředěné cDNA (0,3 µl cDNA/reakce + H<sub>2</sub>O)

Použít: iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

**Protokol:**

Cycle 1: (1X)		
Step 1:	95.0 °C	for 00:30.
Cycle 2: (2X)		
Step 1:	95.0 °C	for 01:00.
Cycle 3: (1X)		
Step 1:	95.0 °C	for 02:00.
Cycle 4: (40X)		
Step 1:	95.0 °C	for 00:15.
Step 2:	53.0 °C	for 00:30.
Step 3:	72.0 °C	for 00:20.
Data collection and real-time analysis enabled.		
Cycle 5: (1X)		
Step 1:	95.0 °C	for 01:00.
Cycle 6: (91X)		
Step 1:	95.0 °C-50.0 °C	for 00:10.
Increase set point temperature after cycle 2 by -0.5 °C		
Melt curve data collection and analysis enabled.		

Každý vzorek zhotovit ve třech technických opakováních.

**Primární analýza dat:**

iQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software (Bio-Rad)

Nejprve z dat pro analýzu odstranit špatné křivky (nemající hladký exponenciální průběh) a výrazně odlehlé hodnoty. Ověřit „melting curves“. Zkontrolovat kalibrační řadu a sklon kalibrační přímky (při každém pokusu byla současně měřena kalibrační řada pro každou dvojici primerů přítomnou v daném pokusu).

**Relativní kvantifikace:**

Zároveň se vzorky byla pro každou dvojici primerů měřena i ředící řada (z chromozomální DNA pro měření s většinou primerů nebo z cDNA směsi pro měření s primery pro detekci sestřižené RNA; ředění 8×) za vzniku kalibrační přímky pro danou dvojici primerů pro daný run. S pomocí této řady byla v každé reakci stanovena koncentrace cDNA detekovaná těmito primery. Hodnoty ze tří technických opakování byly zprůměrovány.

Jako referenční gen sloužil gen *TOM22*. Získaná koncentrace pro určitou dvojici primerů byla vztažena ke koncentraci *TOM22* ve stejném vzorku a tím vznikla hodnota relativní koncentrace sledované RNA pro daný kmen.

Hodnota relativní koncentrace určité RNA detekované jednou dvojicí primerů mutantního kmene byla poté vztažena k hodnotě získané pro kmen divokého typu a to tak, že hodnota pro WT kmen byla položena rovná jedné. Tím jsme získali hodnotu relativní změny koncentrace určité RNA v mutantním kmeni v porovnání s kmenem divokého typu.

Každý pokus byl připraven v několika biologických opakováních a relativní změny koncentrace určité RNA pro různá opakování byly zprůměrovány (a určena SD tohoto průměru). Výsledné hodnoty jsou znázorněné pomocí grafů.

## 4.Cíle

- Potvrdit předpoklad, že přítomnost zkrácené varianty genu *PRP45*, *prp45(1-169)* v genomu kvasinek *S. cerevisiae* způsobuje změnu citlivosti těchto buněk k látkám benomyl a calcofluor white.
- Nalézt gen, jehož přítomnost na replikativním plazmidu v buňkách *prp45(1-169)* potlačí citlivosti mutant k benomylu nebo calcofluoru.
- Připravit kmeny *prp45(1-169)* s delecí intronu v genech *TUB1*, *TUB3*, resp. *COF1*.
- Testovat citlivost nově připravených kmenů ke zvýšené kultivační teplotě 37°C a k benomylu.
- Pomocí metody RT qPCR sledovat změny exprese genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* v buňkách s mutací *prp45(1-169)*, v kombinaci s delecemi intronu *tub1Δi*, *tub1Δi*, resp., *cof1Δi*. Stejnou metodou testovat expresi genu *COF1* nesoucí v laboratoři nalezenou mutaci v intronu.

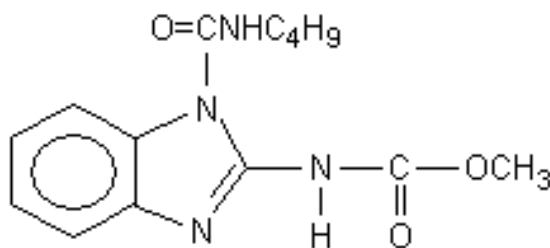
## 5. Výsledky

### 5.1. Citlivost buněk *prp45(1-169)* k benomylu nebo calcofluoru

#### 5.1.1. Test citlivosti kvasinek *prp45(1-169)* k látkám benomyl a calcofluor white

Tato práce navazuje na předchozí výsledky naší laboratoře. Kateřina Abrhánková připravila N-koncovou deleční variantu genu *PRP45*, která kóduje zkrácený protein Prp45 o délce 169 aminokyselinových zbytků z původních 379 (Gahura *et al.*, 2009). Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (dále jen kvasinky) nesoucí v genomu zkrácenou verzi genu *PRP45*, *prp45(1-169)*, jsou mimo jiné citlivé na mikrotubulární inhibitor nocodazol a při barvení fluorescenčním barvivem calcofluor white je u nich možné pozorovat abnormální hromadění chitinu v buněčné stěně (viz. kap. Literární přehled).

Benomyl (Obr.1) je látka funkčně podobná nocodazolu. Vzhledem k zjištěné citlivosti kvasinek *prp45(1-169)* na nocodazol (Gahura *et al.*, 2009) je možné očekávat, že i přítomnost benomylu v médiu bude potlačovat růst buněk s mutací *prp45(1-169)*. Benomyl patří mezi mikrotubulární inhibitory, váže se na mikrotubuly a brání jejich polymeraci, inhibuje také mitotické vřeténko a poškozuje tak proces dělení buněk.

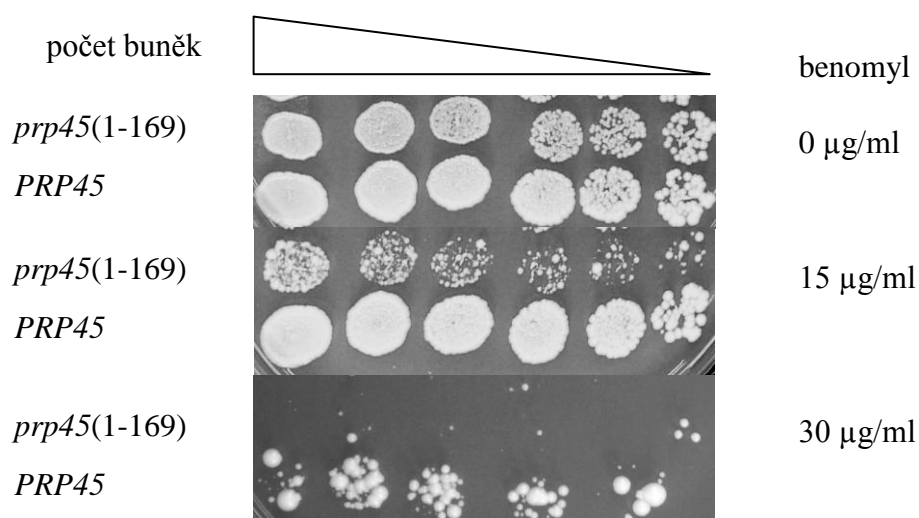


Obr. 1 Chemická struktura benomylu



Při testu citlivosti k benomylu byla porovnávána schopnost růstu kvasinek *prp45(1-169)* s buňkami divokého typu při kapkovém testu. Kvasinky byly kultivovány v tekutém komplexním médiu (YPAD) do střední logaritmické fáze a po definovaném naředění nakapány na plotny s komplexním médiem (YPAD) doplněným o benomyl v různých koncentracích.

Při porovnání kvasinek mutantních s kvasinkami divokého typu (Obr. 2) je možné pozorovat zhoršení růstu za přítomnosti tohoto inhibitoru. Z těchto výsledků tak vyplývá, že kvasinky *prp45(1-169)* vykazují zvýšenou citlivost k benomylu.



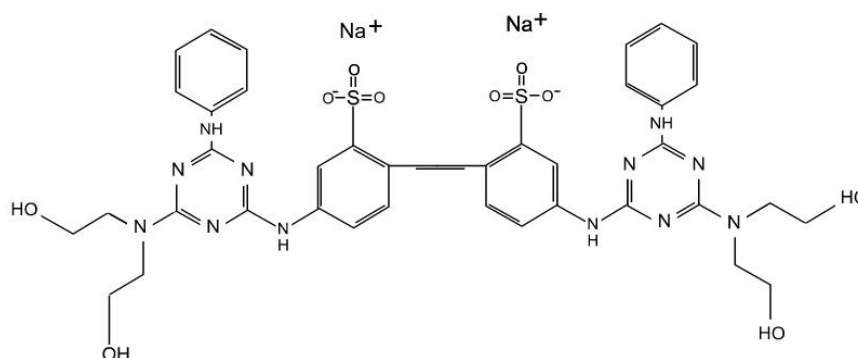
Obr. 2 Citlivost k benomylu

Kvasinky byly kultivovány v tekutém komplexním médiu (YPAD) do střední logaritmické fáze a po naředění do deionizované vody nakapány na plotny s komplexním médiem (YPAD) obsahujícím různé množství benomylu (0, 15, 30 µg/ml). První skvrna zleva reprezentuje 5 ul buněčné suspenze OD 0,1 a další vždy 1/3 předchozí.

U kvasinek nesoucích zkrácenou variantu genu *prp45*(1-169) byly pozorované aberantní depozice chitinu ve stěně buňky při barvení fluorescenčním barvivem calcofluor white (Abbrhánová, 2010).

Calcofluor White (CFW) se specificky váže na chitin a celulosu, a proto se používá k jejich vizualizaci prostřednictvím fluorescence. Kvasinky *S. cerevisiae* divokého typu obsahují ve své buněčné stěně jen velmi malé množství chitinu, který je v rámci buněčné stěny rozložen nerovnoměrně a nachází se především v oblasti jizev. Chitinu v průběhu stárnutí buňky ve stěně přibývá.

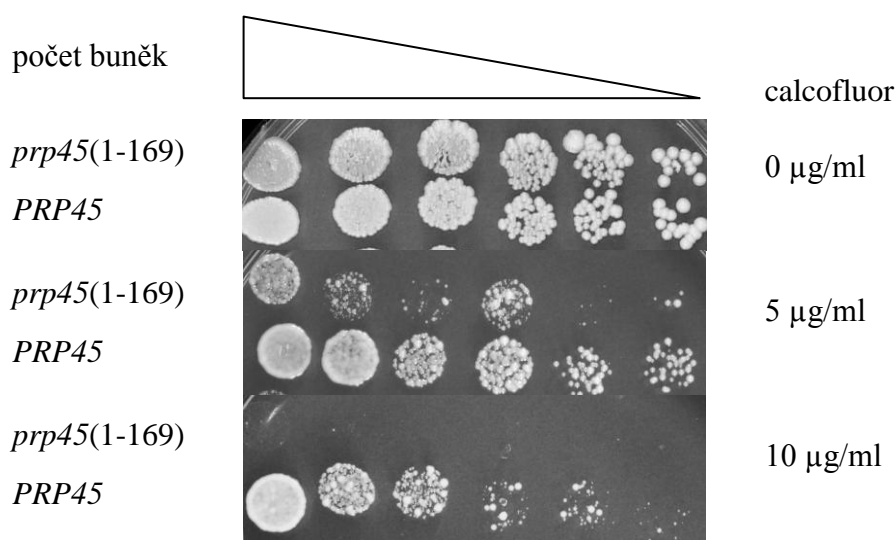
Pokud je CFW přítomen v médiu pak není zcela jasný mechanismus jeho působení na kvasinkové buňky, ale obecně se citlivost ke calcofluoru pokládá u kvasinek *S. cerevisiae* za důkaz poškození buněčné stěny.



Obr. 3 Chemická struktura calcofluoru

Citlivost kvasinek *prp45*(1-169) k přítomnosti látky CFW v médiu byla testována stejným způsobem jako citlivost těchto kvasinek k benomylu.

Bylo zjištěno, že kvasinky *prp45*(1-169) jsou ke calcofluoru citlivější než kvasinky divokého typu (Obr 4).



Obr. 4 Citlivost ke calcofluoru

Postup kultivace buněk a příprava kapkových testů stejné jako u u předchozího pokusu (viz Obr. 1).

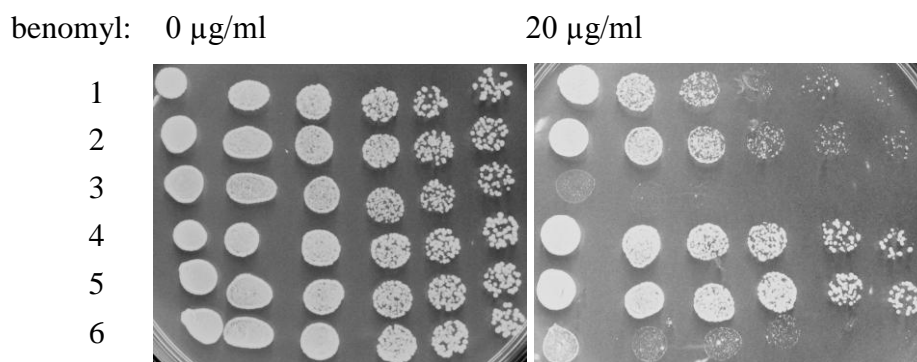
#### 5.1.2. *Hledání proteinu, který by při nadprodukci reparaoval sledovaný fenotyp buněk prp45(1-169)*

V další sérii pokusů jsme se pokusili nalézt geny potlačující citlivost buněk *prp45(1-169)* k benomyly nebo calcofluoru pomocí transformace genomovou knihovnou. Buňky kmene *prp45(1-169)* byly transformovány genomovou knihovnou v plasmidu YEp13 (Nasmyth a Tatchell, 1980) a vysety na plotny selektující transformanty. Narostlé kolonie byly přetiskány na plotny (metodou „replica plating“) s benomyly nebo calcofluorem. Pro další testování byly použity ty, u kterých došlo k nárůstu rezistence k benomyly nebo calcofluoru. Následně jsme rezistenci ještě ověřili pomocí kapkového testu. PCR detekce dále posloužila k vyloučení těch klonů, kde supresi citlivosti způsobila přítomnost divoké alely genu *PRP45* na plasmidu. Z vybraných klonů byly izolovány plasmidy a transformovány zpět do kmenů *prp45(1-169)* a *PRP45*. Opakovaně jsme testovali citlivost těchto transformantů k benomyly. Inzerty těchto plasmidů byly sekvenovány.

Žádný plasmid, jehož přítomnost by u buněk *prp45(1-169)* zvyšovala rezistenci ke calcofluoru nebyl nalezen.

Byly identifikovány tři plasmidy zvyšující rezistenci k benomylu, pJKA1, pJKA2 a pJK01.

Plasmidy pJKA1 a pJKA2 zvyšují rezistenci k benomylu více u buněk nesoucích divokou alelu genu *PRP45* než u mutantních buněk *prp45(1-169)*. Efekt těchto plasmidů je tedy obecný, nikoliv specifický pro buňky s mutací *prp45(1-169)* (Obr 5). Sekvenováním inzertů těchto plasmidů bylo zjištěno, že oba plasmidy nesou gen *YAP1*, což je transkripční faktor zodpovědný za reakci na stres.

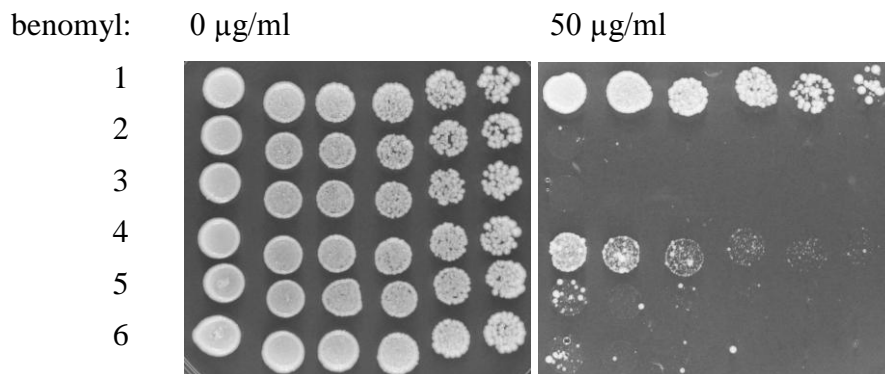


Obr. 5 Citlivost kvasinek nesoucích plasmidy pJKA1 a pJKA2 k benomylu

- 1 TSY01: *prp45(1-169)* + pJKA2
- 2 TSY01: *prp45(1-169)* + pJKA1
- 3 TSY01: *prp45(1-169)*
- 4 KGY823: *PRP45* + pJKA2
- 5 KGY823: *PRP45* + pJKA1
- 6 KGY823: *PRP45*

Postup kultivace buněk a příprava kapkových testů podobné jako u předchozích pokusů (viz Obr. 1).

Plasmid pJK01 zvyšuje více rezistenci k benomylu buněk s mutací *prp45(1-169)* než buněk *PRP45* WT (Obr 6).

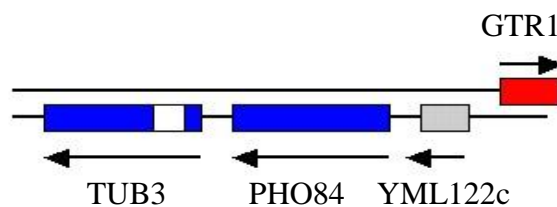


Obr. 6 Citlivost kvasinek nesoucích plasmid pJK01 k benomylu

- 1 TSY01: *prp45(1-169)* + pJK01
- 2 TSY01: *prp45(1-169)* + prázdný vektor Yep13
- 3 TSY01: *prp45(1-169)*
- 4 KGY823: *PRP45* + pJK01
- 5 KGY823: *PRP45* + prázdný vektor Yep13
- 6 KGY823: *PRP45*

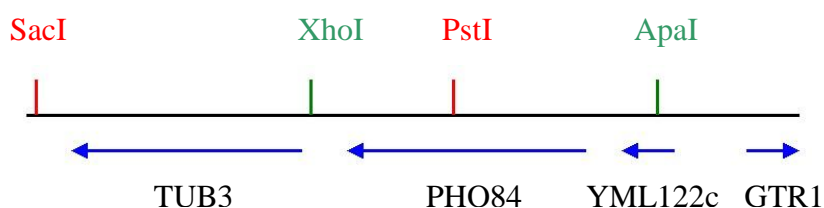
Postup kultivace buněk a příprava kapkových testů stejné jako u předchozích pokusů (viz Obr. 1).

Inzert plasmidu pJK01 byl sekvenován a bylo zjištěno, že se zde nachází tři celé geny, *YML122c*, *PHO84* a *TUB3* a fragment genu *GTR1* (Obr 7 a též - schéma celého plasmidu pJK01 viz kap. Materiál a metody).



Obr. 7 Schématické znázornění inzertu plasmidu pJK01

Pokusili jsme se zjistit, který gen z inzertu plasmidu pJK01 je zodpovědný za zvýšení rezistence kvasinek *S. cerevisiae prp45(1-169)* k benomylu. Jednotlivé geny z plasmidu pJK01 byly vyštěpeny pomocí restričních enzymů a vloženy do jiných vektorů. Použit byl centromerický vektor pRS315 a replikativní vektor (tj. nesoucích 2 $\mu$  sekvenci) pRS325. Gen *TUB3* byl vyštěpen restričními enzymy PstI, SacI a gen *PHO84* enzymy ApaI, XhoI (Obr 8).



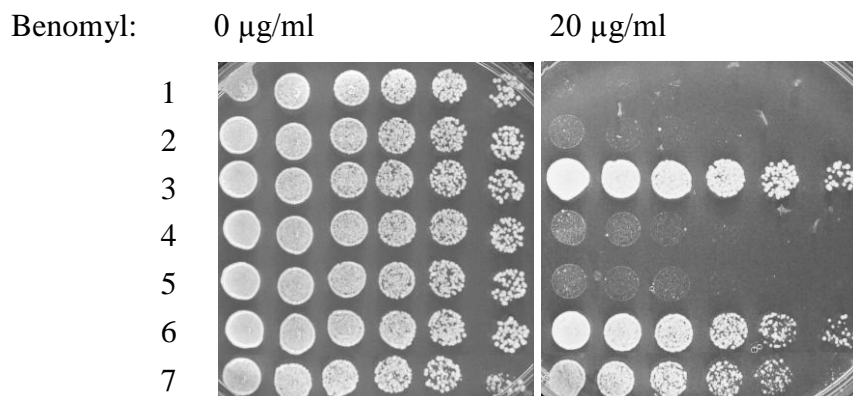
Obr. 8 Vyštěpení genů *TUB3* a *PHO84* z plasmidu pJK01

Gen *TUB3* vyštěpen PstI/SacI – červeně

Gen *PHO84* vyštěpen ApaI/XhoI - zeleně

Nově vzniklé plasmidy pJK02, pJK03, pJK04 a pJK05 (schéma plasmidů viz kap. Materiál a metody) a prázdné vektory pRS315 a pRS325 byly transformovány do kvasinek *prp45(1-169)* a do kvasinek *PRP45*. U těchto transformantů byla metodou kapkového testu testována citlivost na benomyl.

Bylo zjištěno, že za snížení citlivosti k benomylu mutant *prp45(1-169)* je zodpovědný gen *TUB3* (Obr. 9).



Obr. 9 Vliv plasmidů pJK02, pJK03, pJK04 a pJK05 v buňkách *prp45(1-169)* na rezistenci k benomylu

Skvrny v jednotlivých řádcích představují buňky *prp45(1-169)* transformované plasmidy:

- 1 pRS325 (prázdný vektor)
- 2 pJK05 (pRS325 - *PHO84*)
- 3 pJK03 (pRS325 - *TUB3*)
- 4 pRS315 (prázdný vektor)
- 5 pJK04 (pRS315 - *PHO84*)
- 6 pJK02 (pRS315 - *TUB3*)
- 7 pJK01

centromerické plasmidy: pRS315, pJK02 a pJK04

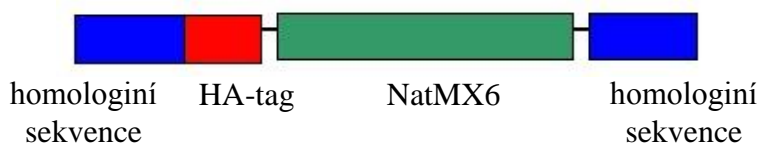
replikativní plasmidy (2 $\mu$ ): pJK01, pRS325, pJK03 a pJK05

Postup kultivace buněk a příprava kapkových testů stejné jako u předchozích pokusů (viz Obr. 1).

## 5.2. Interakce delece intronů genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1* s mutací *prp45(1-169)*

### 5.2.1. Příprava kmenů s delecí intronu v genech *TUB1*, *TUB3*, resp. *COF1* v kombinaci s mutací *prp45(1-169)*

Laskavostí Julie Parenteau nám byly poskytnuty kmeny s delecemi intronů, JPY12F8 *tub1*Δi, JPY11D4 *tub3*Δi, JPY12G9 *cof1*Δi (Parenteau *et al.*, 2008). V těchto kmenech byla vytvořena zkrácená varianta genu *prp45(1-169)* vložení kazety kódující HA-tag a selekční marker *NatMX6* (rezistence na nourseothricin) do genu *PRP45* homologní rekombinací (schématické znázornění inserční kazety Obr. 10). Kazeta byla amplifikována PCR z fragmentu plasmidu p30412 (pFA6a-3HA-natMX6, EUROSCARF, Van Driessche *et al.*, 2005) s použitím primerů KM09 a KM10.



Obr. 10 Schématické znázornění inserční nourseothricinové kazety

Modrá – sekvence zajišťující inserci do místa určené homologní rekombinací, zelená – gen rezistence k nourseothricinu, červeně – sekvence kódující HA-tag.

Integrace kazety do genomu byla ověřena pomocí PCR. Exprese Prp45(1-169)-HA byla detekována metodou Western blot a imunodetekcí prostřednictvím protilátky proti hemagglutininovému (HA) epitopu.

Insercí kazety vznikly kmeny:

- JKY01: *prp45(1-169) tub1*Δi
- JKY02: *prp45(1-169) tub3*Δi
- JKY03: *prp45(1-169) cof1*Δi

(Celkový popis genotypu kmenů viz kap. Materiál a metody)

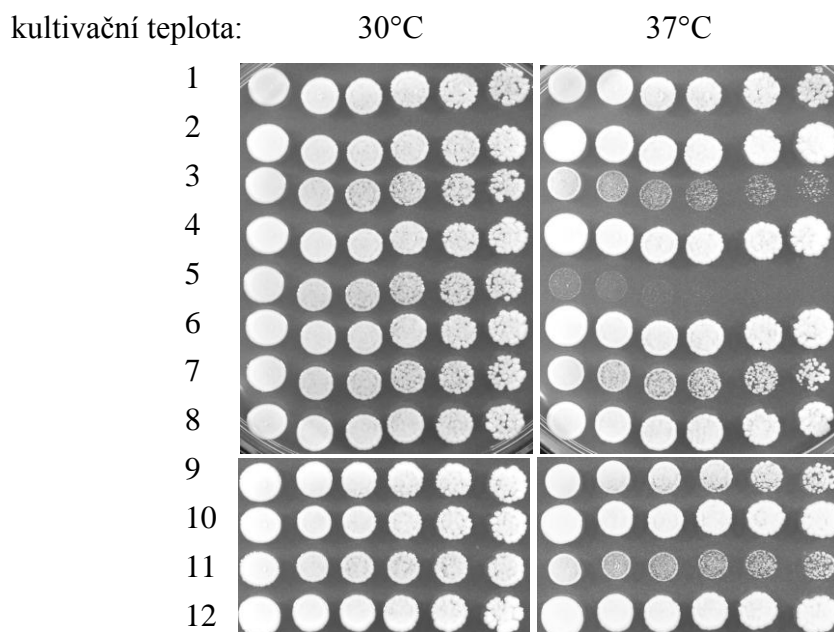


**5.2.2. Test citlivosti kvasinek JKY01 *prp45(1-169) tub1Δi*,  
JKY02 *prp45(1-169) tub3Δi* a JKY03 *prp45(1-169) cof1Δi*  
ke zvýšené teplotě**

Kvasinky *prp45(1-169)* vykazují citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C (Gahura et al., 2009). Pomocí kapkového testu a kultivace v různých teplotách jsme se pokusili zjistit, zda může být tento fenotyp mutanty *prp45(1-169)* ovlivněn delecí některého z intronů v genech *TUB1*, *TUB3* a *COF1*.

Přítomnost delece intronů *tub1Δi*, *tub3Δi* nebo *cof1Δi* v buňkách s divokou alelou genu *PRP45* neměla na růst za zvýšené teploty žádný vliv (Obr. 11).

Vliv delecí intronů na citlivost kvasinek nesoucích zkrácenou verzi genu *prp45(1-169)* ke zvýšené teplotě (37°C) je možné pozorovat na uvedeném obrázku (Obr. 11). Buňky *prp45(1-169) tub3Δi* rostou v kultivační teplotě 37°C lépe než buňky *prp45(1-169)* a naopak dvojitá mutace *prp45(1-169) tub1Δi* zhoršuje růst buněk v 37°C proti buňkám *prp45(1-169)*. U kvasinek *prp45(1-169) cof1Δi* bylo také zaznamenáno mírné snížení citlivosti na teplotu 37°C v porovnání s mutantou *prp45(1-169)* (Obr. 11).



Obr. 11 Citlivost kvasinek ke zvýšené teplotě 37°C

- 1 JKY02: *prp45*(1-169) *tub3*Δi
- 2 JPY11D4: *PRP45 tub3*Δi
- 3 AVY19: *prp45*(1-169)
- 4 JPY10H3: WT
- 5 JKY01: *prp45*(1-169) *tub1*Δi
- 6 JPY12F8: *PRP45 tub1*Δi
- 7 AVY47: *prp45*(1-169)
- 8 JPY10H7: WT
- 9 JKY03: *prp45*(1-169) *cof1*Δi
- 10 JPY12G9: *PRP45 cof1*Δi
- 11 AVY45: *prp45*(1-169)
- 12 JPY10H2: WT

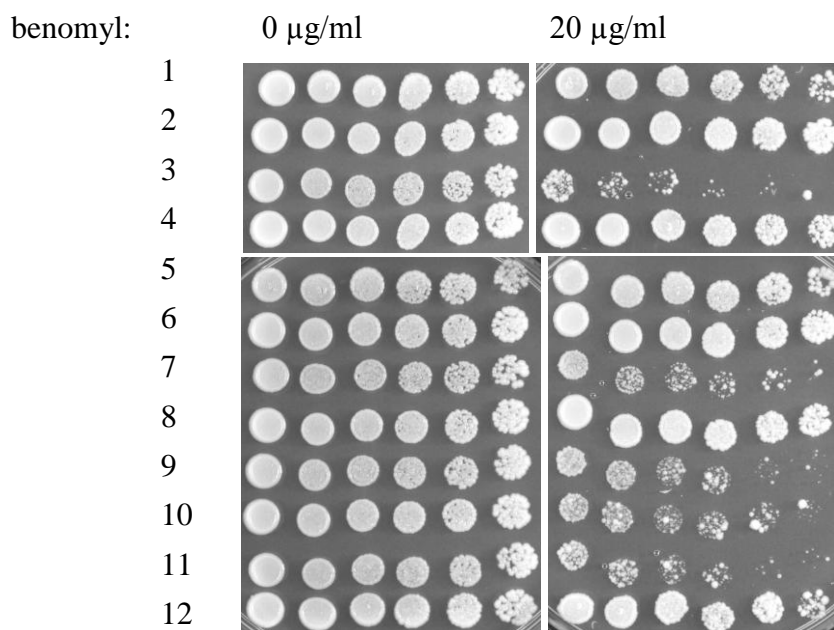
Postup kultivace buněk a příprava kapkových testů stejné jako u předchozích pokusů s benomylem (viz Obr. 1). Plotny s nakapanou suspenzí buněk byly kultivovány v uvedených teplotách (30°C a 37°C).

### 5.2.3. *Test citlivosti kvasinek JKY01 a TSY02 tub1Δi prp45(1-169) a JKY02 tub3Δi prp45(1-169) k benomylu*

Kvasinky *prp45(1-169)* vykazují zvýšenou citlivost k benomylu. V další sérii kapkových testů jsme se pokusili zjistit, zda může citlivost buněk *prp45(1-169)* k tomuto mikrotubulárnímu inhibitoru být ovlivněna delecí intronu z některého genu pro  $\alpha$ -tubulin *TUB1* nebo *TUB3*. Také jsem testovali vliv samotné delece na citlivost k benomylu u buněk *PRP45* WT.

U kmenů JPY12F8 a JPY11D4 neměla delece intronu *tub1Δi* nebo *tub3Δi* vliv na citlivost těchto buněk k benomylu (Obr. 12). V naší laboratoři byla dříve připravená jiná čtveřice genů se stejnými mutacemi jako u kmenů JPY10H7, AVY47, JPY12F8 a JKY01, ale s jiným genetickým pozadím, KGY823 WT, TSY01 *prp45(1-169)*, KGY2914 *tub1Δi* a TSY02 *prp45(1-169) tub1Δi* (Šimonová, 2006). U těchto buněk bylo zjištěno, že delece *tub1Δi* způsobuje u buněk zvýšení citlivosti k benomylu bez ohledu na přítomnost mutace v *PRP45* genu (Obr. 12). Tento rozdíl v citlivosti u buněk s delecí stejného intronu je tak zřejmě způsoben rozdílným genetickým pozadím. Podobně mohl vliv genetického pozadí způsobit rozdíly ve výsledcích dvou studií u kvasinkových buněk nesoucích delecí *act1Δi* (Juneau et al., 2006; Parenteau et al., 2008).

U kmenů JKY01 a JKY02 bylo zjištěno, že delece intronu *tub1Δi* i delece intronu *tub3Δi* snižuje u buněk s mutací *prp45(1-169)* citlivost k benomylu (Obr.12).



Obr. 11 Citlivost kvasinek *tub1*Δi a *tub3*Δi k benomylu

- 1 JKY02: *prp45*(1-169) *tub3*Δi
- 2 JPY11D4: *PRP45 tub3*Δi
- 3 AVY19: *prp45*(1-169)
- 4 JPY10H3: WT
- 5 JKY01: *prp45*(1-169) *tub1*Δi
- 6 JPY12F8: *PRP45 tub1*Δi
- 7 AVY47: *prp45*(1-169)
- 8 JPY10H7: WT
- 9 TSY02: *prp45*(1-169) *tub1*Δi
- 10 KGY2914: *PRP45 tub1*Δi
- 11 TSY01: *prp45*(1-169)
- 12 KGY823: WT

Postup kultivace buněk a příprava kapkových testů stejné jako u předchozích pokusů s benomyem (viz Obr. 1).

### **5.3. Detekce exprese genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* pomocí metody RT qPCR**

RT qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) je běžně používaná, vysoce citlivá metoda, která umožňuje kvantifikovat množství vybrané RNA v buňce. Jedná se o kombinaci tří kroků: reverzní transkripce - převedení RNA na cDNA, amplifikace cDNA pomocí PCR, detekce a kvantifikace produktů během PCR (přesný postup viz kap. Materiál a metody).

Kvasinky byly kultivovány v tekutém komplexním médiu (YPAD) do střední logaritmické fáze, následně z nich byla izolována RNA. Tato RNA byla pomocí primerů v podobě náhodných hexanukleotidů a reverzní transkriptázy přepsána na cDNA. Množství určité konkrétní cDNA bylo stanoveno pomocí kvantitativní real-time PCR. Pro každou dvojici primerů pro qPCR byla vždy v každém pokusu vytvořena kalibrační křivka, pomocí které bylo možné určit hladinu cDNA v jednotlivých vzorcích. Naměřené hodnoty cDNA byly normalizovány na hladinu cDNA genu *TOM22*, který není mutací v genu *PRP45* nijak ovlivněn. Touto normalizací byly srovnány rozdíly v celkovém množství cDNA v jednotlivých vzorcích. Předpokládá se, že množství signálu je lineární nejen k množství cDNA, ale rovněž k množství příslušné mRNA. Hodnota získaná pro určitý typ RNA v konkrétních buňkách byla poté vztažena k hodnotě naměřené pro stejný typ RNA v kvasinkách divokého typu (WT), a to tak, že WT hodnota byla položena rovna jedné. U každého měření bylo vytvořeno několik biologických opakování (první z opakování pro kmen KAY02 změřil Ondřej Gahura). Výsledné grafy ukazují průměrnou změnu hladiny určité RNA vůči této hladině v buňkách divokého typu.

### 5.3.1. Testované kmeny

Pro měření exprese genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* bylo použito několik kmenů nesoucích ve svém genomu zkrácenou verzi genu *PRP45*, *prp45*(1-169).

KAY02 obsahující *prp45*(1-169) byl odvozen od buněk divokého typu EGY 48, vložením sekvence kódující HA-tag a selekční kazetu *kanMX6* pomocí procesu homologní rekombinace (Abrahámová, 2010; Gahura *et al.*, 2009). Kmeny EGY 48 a KAY02 mají tudíž stejné genetické pozadí a liší se pouze v genu *PRP45*. Hodnoty naměřené pro kmen KAY02 byly proto vztahovány k hodnotám získaným pro kmen EGY 48.

Dále byly použity kmeny AVY47, AVY19 a AVY45, které rovněž nesou delecí *prp45*(1-169). Tato mutace byla vytvořena vložením sekvence kódující HA-tag a selekční kazetu *NatMX6*, a to do kmenů JPY10H7, JPY10H3 a JPY10H2 (Valentová, nepublikováno). Kmeny JPY10H7, JPY10H3 a JPY10H2 nesou divokou alelu genu *PRP45* a byly vytvořeny křížením z kmenů BY4700 a BY4705 (Parenteau *et al.*, 2008). Všechny kmeny AVY47, AVY19, AVY45 a JPY10H7, JPY10H3, JPY10H2 mají stejné genetické pozadí, liší se pouze párovacím typem, autotrofními mutacemi a mutací v genu *PRP45* (viz. kap. Materiál a metody). Kmeny AVY47, AVY19 a AVY45 budou tedy dále souhrnně označovány názvem AVY a hodnoty získané pro tyto kmeny z RT qPCR byly vztaženy na hodnoty naměřené pro kmeny JPY10H7, JPY10H3 a JPY10H2 dále souhrnně označované jako JPY10H.

### 5.3.2. Primery použité pro qPCR

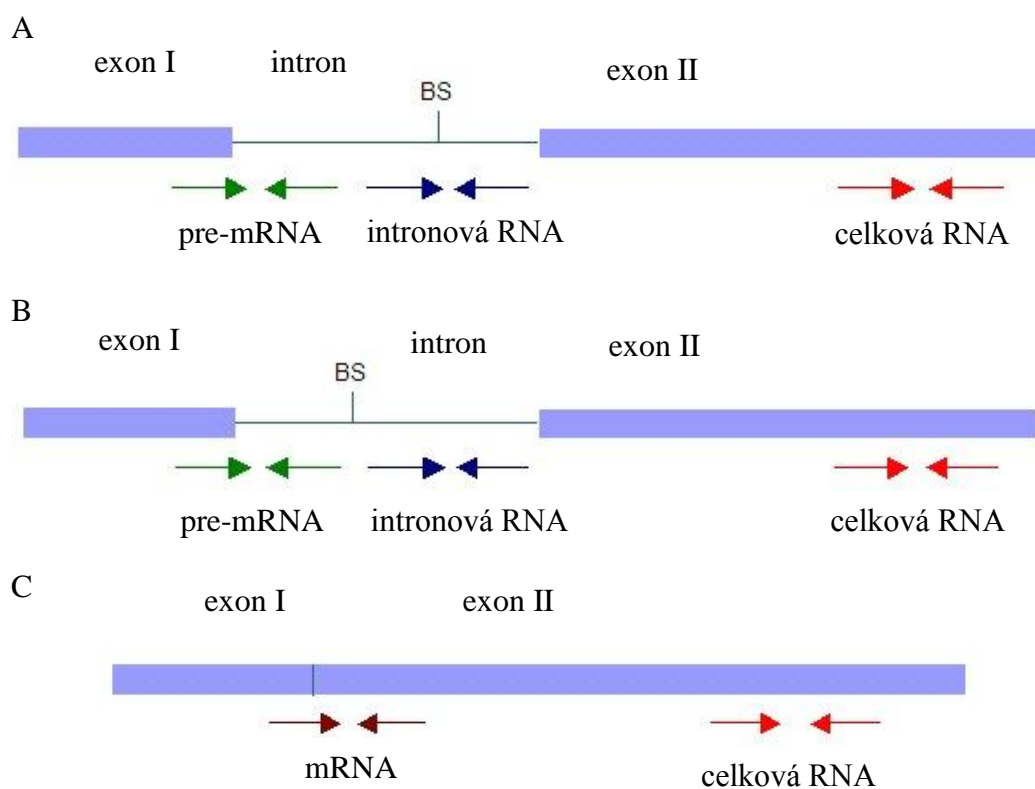
Pomocí RT qPCR jsme v buňkách stanovili množství několika typů RNA:

Pro stanovení celkové RNA (rozumí se veškeré formy RNA vzniklé expresí jednoho určitého sledovaného genu) jsme použili dvojici primerů homologních k sekvenci nacházející se v exonu 2. Tyto primery tak detekují pre-mRNA, lariát-exon 2 strukturu (vzniklou po prvním kroku sestřihu), i sestřiženou mRNA. (Obr.12).

Množství sestřižené mRNA jsme zjišťovali dvojicí primerů, ve které první primer nasedá na spojení exonu 1 s exonem 2. Spojení vzniká po dokončení sestřihu, tyto primery tudíž detekují pouze mRNA (Obr.12 C).

Hladinu pre-mRNA jsme sledovali pomocí primerů, z nichž jeden páruje se sekvencí na rozhraní exon 1-intron a druhý se sekvencí intronu. Tyto primery detekují pouze pre-mRNA, u které ještě nedošlo prostřednictvím prvního kroku sestřihu k oddělení exonu 1 od intronu v 5' sestřihovém místě transkriptu (Obr. 12 A, B).

Také jsme stanovovali množství různých RNA obsahujících intron. Pro geny *TUB1*, *TUB3* a *ACT1* byly navrženy primery tak, že jeden z nich se váže na sekvenci v intronu před místem větvení (branch site, BS) a druhý primer se váže za BS. Tyto primery detekují pouze RNA, která není v místě větvení spojená, tj. pre-mRNA nebo případný degradační produkt po sestřihu, kde došlo k rozpadu lariátové struktury (Obr.12 A). Pro geny *TUB3* a *COF1* máme k dispozici dvojici primerů, které jsou oba homologní k sekvenci za BS. Tyto primery tak mohou kromě pre-mRNA a degradačního produktu po sestřihu detekovat i lariát-exon 2, tj. RNA po prvním kroku sestřihu, i lariátovou strukturu, která sestřihem pre-mRNA vznikla (Obr. 12 B).



Obr. 12 Schematické znázornění hybridizace primerů použitých pro RT qPCR s matricí.

Barevně jsou odlišené jednotlivé dvojice primerů, a to následovně: červená, primery pro detekci celkové RNA; hnědá, primery pro detekci mRNA; zelená, primery pro detekci pre-mRNA; modrá, primery pro detekci intron obsahující RNA.

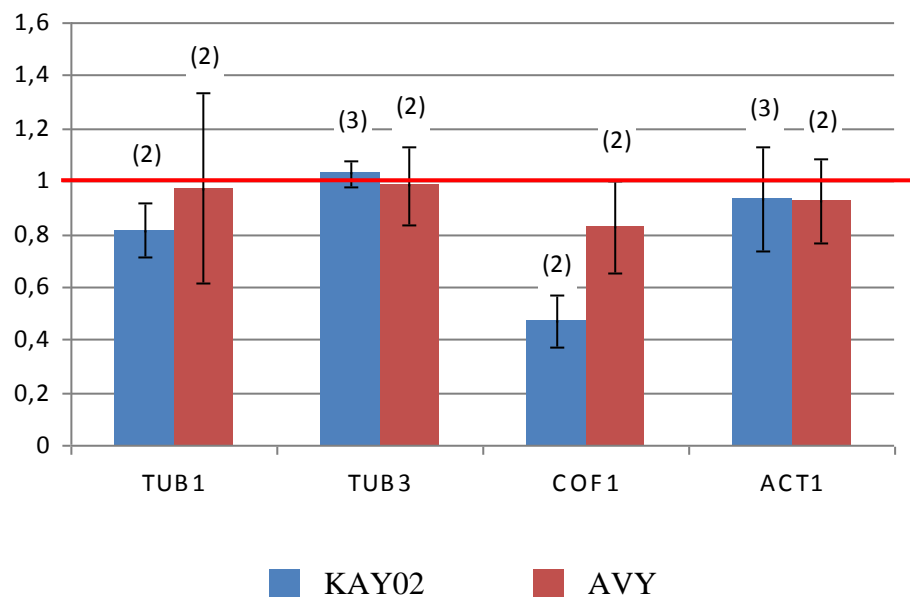
A, B: nesestřižená RNA; C: mRNA; BS: místo větvení (branch site)

Primery navrhl Ondřej Gahura



### 5.3.3. Vliv mutace *prp45(1-169)* na expresi sledovaných genů

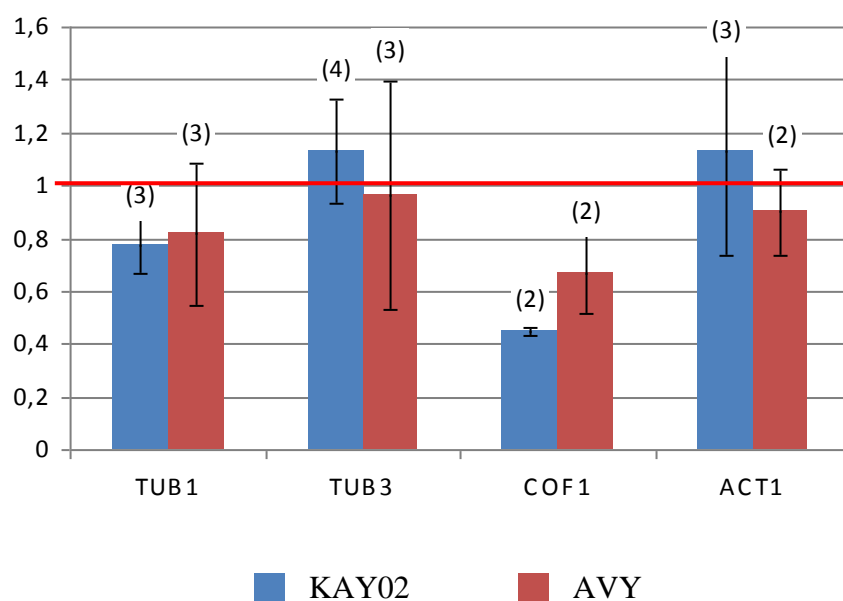
Nebylo zjištěno, že by přítomnost mutace *prp45(1-169)* v kvasinkách měla vliv na množství celkové a sestřižené RNA genů *TUB1*, *TUB3* a *ACT1*. Z uvedených výsledků vyplývá, že exprese genu *COF1* je zkrácením genu *PRP45* ovlivněna. Hladina celkové i sestřižené RNA genu *COF1* je u buněk *prp45(1-169)* snížena vzhledem k množství RNA v buňkách divokého typu (Obr. 13 a 14). U kmene KAY02 je tento efekt výraznější, hladina mRNA *COF1* je proti buňkám divokého typu (EGY 48) snížena přibližně o 50% (Obr. 14). Kmen AVY vykazuje menší snížení, hladina mRNA *COF1* v těchto buňkách představuje přibližně 70% hladiny mRNA *COF1* v buňkách divokého typu JPY10H (Obr. 14).



Obr. 13 Relativní hodnoty celkové RNA genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* v buňkách *prp45(1-169)*

Hodnoty získané pro kmeny *prp45(1-169)* byly vztaženy k hodnotám získaným pro kvasinky divokého typu.

Každý sloupec představuje průměr z několika biologických opakování, počet opakování uvádí číslo v závorce. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku.

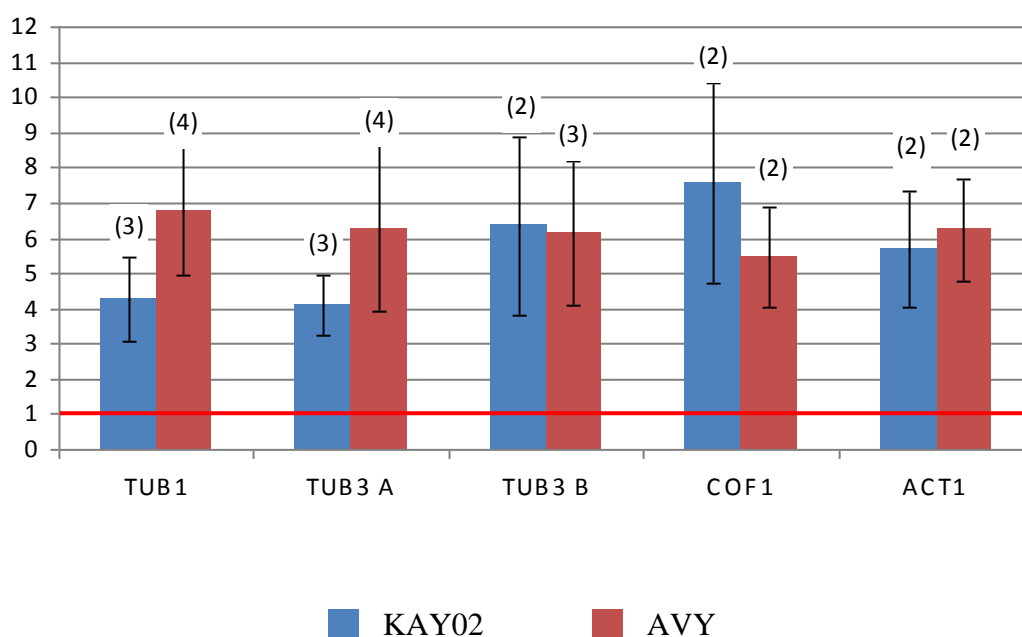


Obr. 14 Relativní hodnoty sestřížené mRNA genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* v buňkách *prp45(1-169)*

Vyhodnocení a znázornění dat stejné jako u celkové RNA viz popis obr. 13.

V další sérii qPCR testů jsme použili dvojice primerů, které detekují RNA obsahující intron, a dvojice primerů určené ke stanovení hladiny pre-mRNA. Při použití těchto dvojic primerů bylo objeveno výrazné nabohacení sledovaných RNA v buňkách *prp45(1-169)* proti množství detekovanému v buňkách divokého typu. Tento jev byl zaznamenán u všech testovaných genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* i *ACT1* u obou testovaných kmenů KAY02 a AVY nesoucích mutaci *prp45(1-169)*. Nabohacení RNA se většinou pohybovalo v intervalu čtyři až sedmkrát více RNA než jaká je hladina stejné RNA v buňkách divokého typu.

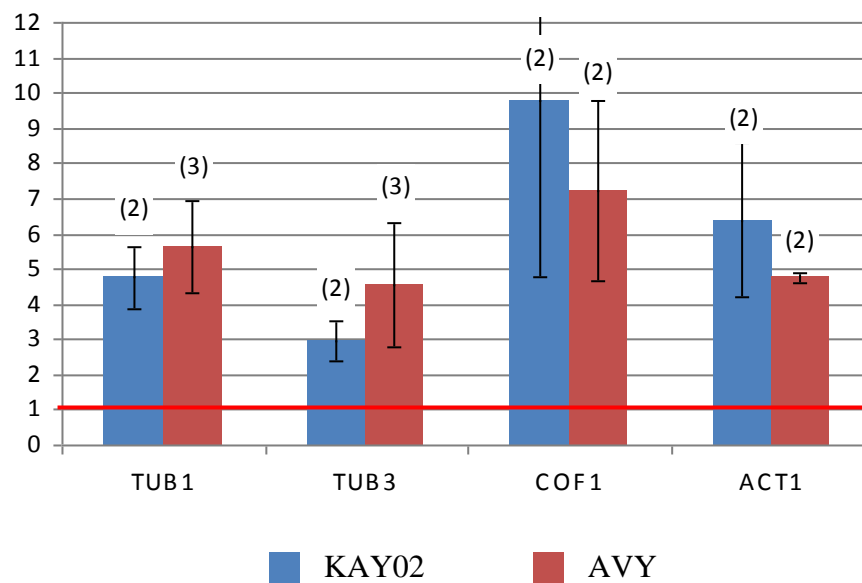
Pro gen *TUB3* byly navrženy dvě dvojice primerů detekujících intron obsahující RNA. Jedna dvojice primerů (A) se váže tak, že první primer je homologní k sekvenci v intronu před místem větvení (branch site, BS) a druhý primer k sekvenci v intronu za BS. Tyto primery detekují především pre-mRNA. V druhé dvojici primerů (B) jsou oba primery homologní k sekvenci v intronu za BS. Tyto primery tak mohou kromě pre-mRNA detekovat i další typy RNA (viz kap. 1.3.2. Primery použité pro qPCR).



Obr. 15 Relativní hodnoty intron obsahující RNA genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* v buňkách *prp45(1-169)*

*TUB1*, *TUB3* A, *ACT1*: RNA detekována primery, které nasedají přes místo větvení (BS); *TUB3* B, *COF1*: RNA detekována primery, které oba nasedají za BS

Vyhodnocení a znázornění dat stejné jako u celkové RNA viz popis obr. 13.



Obr. 16 Relativní hodnoty pre-mRNA genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* v buňkách *prp45(1-169)*

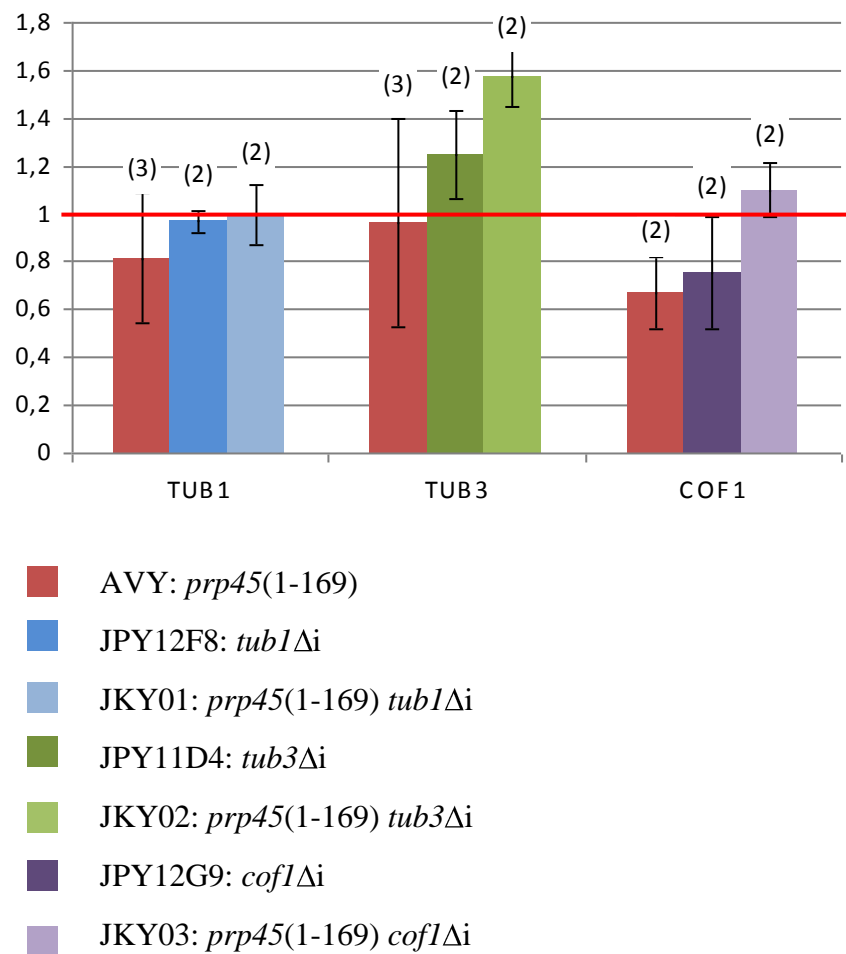
Vyhodnocení a znázornění dat stejné jako u celkové RNA viz popis obr. 13.

#### **5.3.4. Vliv delece intronu z genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1* na expresi těchto genů v buňkách *prp45(1-169)***

Delece intronu z genu *TUB1* v buňkách kvasinky nesoucí divokou alelu genu *PRP45* neovlivnila hladinu mRNA *TUB1*. Buňky nesoucí mutaci *tub3Δi* mají hladinu *TUB3* mRNA lehce zvýšenou a buňky *cof1Δi* mají hladinu *COF1* mRNA nepatrně sníženou proti hladině mRNA v kvasinkách divokého typu (Obr. 17).

Dvojitá mutanta *prp45(1-169) tub1Δi* v buňkách kvasinek nezpůsobí žádnou změnu v hladině mRNA genu *TUB1*. Buňky s mutacemi *prp45(1-169) tub3Δi* obsahují zvýšené množství mRNA genu *TUB3*, a to jak proti buňkám divokého typu a buňkám *prp45(1-169)*, tak i proti buňkám *tub3Δi*. Podobný efekt je možné pozorovat u genu *COF1*. Dvojitý mutant *prp45(1-169) cof1Δi* obsahuje větší množství mRNA proti buňkám *prp45(1-169)* a buňkám *cof1Δi*, hladina mRNA dvojitého mutanta tak odpovídá hladině mRNA *COF1* získané pro buňky divokého typu (Obr. 17).

Zjišťovali jsem také zda existuje nějaký úzký vztah mezi geny pro tubulin  $\alpha$ , *TUB1* a *TUB3*. Delece intronu *tub1Δi* neovlivnila významně expresi genu *TUB3*, a také při deleci intronu *tub3Δi* nebyl pozorován výrazný efekt na expresi genu *TUB1*. Kvasinky *tub1Δi* nevykazovaly výraznou změnu hladiny *TUB3* mRNA ani neměly nabohacenou intron obsahující RNA *TUB3*. Dvojitý mutant *prp45(1-169) tub1Δi* neměl ovlivněnu hladinu mRNA *TUB3* a obsahoval výrazně nabohacenou RNA obsahující intron pocházející z genu *TUB3*, neboli vykazoval stejné změny v hladinách RNA *TUB3* jako mutant nesoucí pouze *prp45(1-169)*. Podobné výsledky byly získány pro expresi *TUB1* v buňkách *tub3Δi* a v buňkách *prp45(1-169) tub3Δi* (data neuvedena).



Obr. 17 Relativní hodnoty sestřižené mRNA genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1*

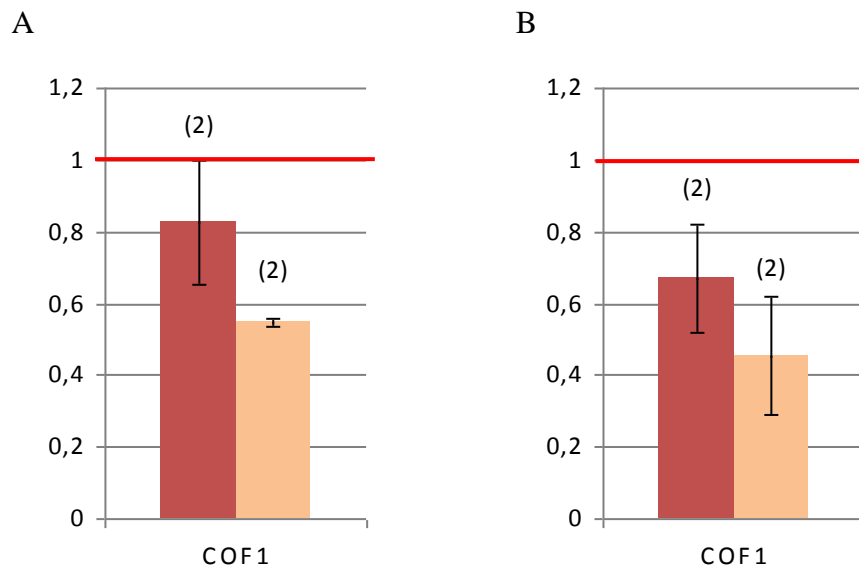
Vyhodnocení a znázornění dat stejné jako u celkové RNA viz popis obr. 13.

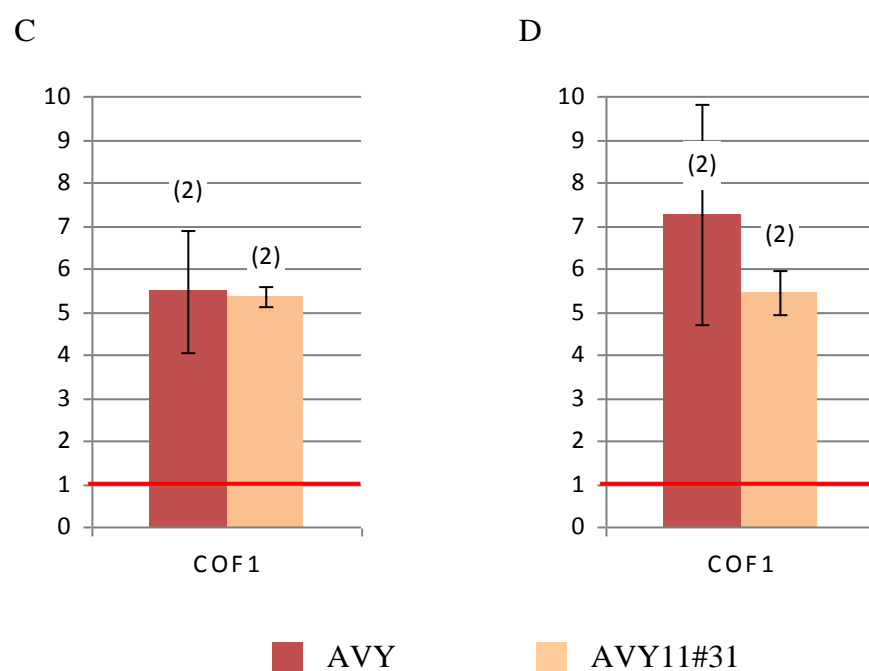
### 5.3.5. Vliv mutace v intronu genu *COF1* na expresi tohoto genu

V naší laboratoři byla vytvořena mutace v intronu genu *COF1*, která je synteticky letální se zkrácením genu *prp45(1-169)* (Valentová, 2008). Buňky nesoucí tuto mutaci v intronu *COF1* a zároveň mající v genomu deleční variantu *prp45(1-169)* musí obsahovat plasmid s intaktní divokou alelou genu *PRP45*, ztráta tohoto plasmidu je pro tyto buňky letální. Tento kmen byl označen AVY11#31.

Kmen AVY11#31 nebyl přímo odvozen ani od buněk divokého typu EGY48 ani od buněk JPY10H. Nemá proto stejné genetické pozadí ani s jedním z těchto kmenů. Na základě bližší příbuznosti s kmenem JPY10H byly výsledky získané pro kmen AVY11#31 vztahovány k hodnotám naměřeným pro buňky divokého typu JPY10H.

Bylo zjištěno, že mutace v *COF1* intronu nacházející se v kmeni AVY11#31 výrazně ovlivňuje expresi genu *COF1*. Buňky AVY11#31 vykazují snížení hladiny celkové RNA genu *COF1* i sestřižené *COF1* mRNA. Toto snížení je výraznější než u buněk *prp45(1-169)* (Obr. 18 A a B). Dále pak i v kvasinkách AVY11#31 dochází k hromadění RNA obsahující intron a pre-mRNA. Tento nárůst množství RNA je srovnatelný s nárůstem, který vykazují buňky nesoucí zkrácenou variantu genu *prp45(1-169)* (Obr.18 C a D).





Obr. 18 Relativní hodnoty *COF1* RNA

A: celková RNA; B: sestřižená mRNA; C: intron obsahující RNA; D: pre-mRNA

Vyhodnocení a znázornění dat stejné jako u celkové RNA viz popis obr. 13.



## 6. Diskuze

### 6.1. Citlivost kvasinek *S. cerevisiae prp45(1-169)* ke calcofluoru, k benomylu a ke zvýšené teplotě

#### 6.1.1. Citlivost buněk *prp45(1-169)* ke calcofluoru

Zjistili jsme, že kvasinky *S. cerevisiae* nesoucí ve svém genomu zkrácenou verzi genu *PRP45*, *prp45(1-169)* jsou více citlivé ke calcofluoru přítomnému v médiu než kvasinky nesoucí divokou alelu genu *PRP45*.

Calcofluor White se váže na chitin, vyskytující se u kvasinky *S. cerevisiae* v buněčné stěně. Je-li tato fluorescenční látka přítomná v kultivačním médiu pak váže nascentní řetězce chitinu, a ve vyšší koncentraci brání polymeraci jeho vláken (Elorza *et al.*, 1983). Citlivost k CFW je považována za indikátor narušení buněčné stěny. Pozorované abnormální ukládání chitinu v buněčné stěně (Abbrámová, 2010) a hypersenzitivita ke calcofluoru naznačují existenci defektů v buněčné stěně u buněk *prp45(1-169)*.

Existují minimálně dvě možná vysvětlení popsaného fenotypu. První spočívá v oslabení sestřihu intronu genu *ECM33*. Funkce produktu tohoto genu není přesně známa, ale jedná se o GPI kotvou k membráně vázaný protein, o kterém se předpokládá, že by mohl hrát roli při syntéze buněčné stěny a jehož delece způsobí u buněk zvýšenou citlivost ke calcofluoru (Lussier *et al.*, 1997). Mutace v genu pro sestřihový faktor *Prp19*, *pso4-I*, vede k hypersenzitivitě buněk ke calcofluoru a zároveň bylo v takto mutantních buňkách pozorováno zhoršení sestřihu intronu *ECM33* genu. Autoři z toho vyvozují, že citlivost ke calcofluoru je u buněk mutantních v genu *PRP19* způsobena právě poškozením sestřihu pre-mRNA genu *ECM33* (Revers *et al.*, 2002). Je tedy možné, že i mutace *prp45(1-169)* způsobuje poškození sestřihu genu *ECM33*, a tím dochází k poškození buněčné stěny a ke zvýšení citlivosti ke calcofluoru.

Druhou možností je vysvětlení týkající se poškození aktinového cytoskeletu. Chitin je v buňce *S. cerevisiae* produkován třemi chitin syntázami Chs1, Chs2 a Chs3. Enzymy Chs1 a Chs2 jsou produkovány jen v určité fázi buněčného cyklu, a poté jsou rychle degradovány. Chs3 je syntetizován stále a v buňce se vyskytuje v membránových váčcích zvaných chitosomy. Na transportu chitosomů k cytoplazmatické membráně se podílí více proteinů. Chitosomy se pohybují po aktinových vláknech pomocí molekulového motoru myosinového typu Myo2 (Santos and Snyder, 1997). Kvasinky nesoucí mutaci *myo2-66* vykazovaly abnormální, delokalizované hromadění chitinu v celé buněčné stěně (Johnston *et al.*, 1991) a podobný fenotyp byl pozorován i u buněk nesoucích různé mutace v genu *ACT1* (Novick and Botstein, 1985). Další gen spojený s aktinovým cytoskeletem, jehož poškození vede k výrazné delokalizaci chitinu je gen pro profilin *PFY1* (Haarer *et al.*, 1990). Již dříve byla v naší laboratoři u buněk nesoucích mutaci *prp45(1-169)* potvrzena nižší míra exprese genu *PFY1* (Abbrámová, 2010) a pomocí RT-qPCR bylo pozorováno snížení hladiny mRNA genu *COF1*, jehož produkt cofilin, je také úzce spojen s dynamikou mikrofilament. Je tudíž možné, že pozorovaný fenotyp spočívající ve zvýšené citlivosti buněk *prp45(1-169)* ke calcofluoru je spojen s poškozením aktinového cytoskeletu.

Jedním z dílčích úkolů mé práce bylo pokusit se nalézt gen, jehož přítomnost v buňce *prp45(1-169)* na replikativním plasmidu by reparovala fenotyp zvýšené citlivosti kvasinek *prp45(1-169)* ke calcofluoru. Mutantní kvasinkové buňky byly transformovány genomovou knihovnou vytvořenou v Yep13 replikativním vektoru a byly selektovány klony u kterých došlo k nárůstu rezistence.

Žádný gen, jehož přítomnost v buňce *prp45(1-169)* na plasmidu by potlačila citlivost mutant ke calcofluoru, nebyl nalezen. Protein Prp45 může ovlivňovat sestřih mnoha genů (Albers *et al.*, 2003). Je proto možné, že se na vzniku pozorované zvýšené citlivosti v *prp45(1-169)* mutantních buňkách spolupodílí poškození více faktorů, které nebylo možné uvedenou technikou naráz zachytit. Lze si ovšem též představit, že na zvýšení citlivosti se podílí oslabení sestřihu intronu jen jediného genu, ale do té míry, že není možné prostým zvýšením genové dóze (přidáním další intron obsahující kopie genu na plasmidu) dosáhnout zvýšení hladiny příslušné mRNA na úroveň hladiny v buňkách divokého typu.

### **6.1.2. Citlivost buněk *prp45(1-169)* k benomylu a hledání proteinu, který by při nadprodukci reparaoval sledovaný fenotyp**

Z našich, zde uvedených, výsledků vyplývá, že buňky nesoucí v genomu mutaci *prp45(1-169)* vykazují fenotyp zvýšené citlivosti k benomylu. Benomyl patří mezi mikrotubulární inhibitory, poškozuje mitotické vřeténko a proces buněčného dělení.

Pokusili jsme se nalézt geny potlačující u mutantních buněk citlivost k benomylu. K tomuto účelu jsme použili transformaci kvasinek *prp45(1-169)* genomovou knihovnou vytvořenou v replikativním vektoru Yep13.

Buňky nesoucí mutaci *prp45(1-169)* vykazují poruchy v sestřihu, přičemž chybějící C-terminální část proteinu se podílí na vazbě helikázy Prp22 do spliceosomu (Gahura *et al.*, 2009). Doufali jsme proto, že se nám podaří nalézt geny kódující jiné sestřihové faktory v nadprodukci substituující chybějící C-terminální část Prp45 (např. Prp22). Toto očekávání ale nebylo naplněno. Nenalezli jsem žádné geny kódující faktory podílející se na sestřihu, které by při nadprodukci z plasmidu reparaovaly sledovaný fenotyp.

Při prohledávání genomové knihovny za účelem nalezení supresoru hypersenzitivity kvasinek *prp45(1-169)* k benomylu byl nalezen gen *TUB3*. Přítomnost plasmidu s tímto genem sice zvyšuje také rezistenci WT buněk k benomylu, ale kvasinky nesoucí mutaci *prp45(1-169)* a plasmid s genem *TUB3* byly k benomylu více rezistentní než buňky divokého typu se stejným plasmidem.

*TUB3* je neesenciální minoritní gen pro tubulin  $\alpha$  a je známo, že jeho delece způsobuje citlivost buněk k benomylu. Majoritním genem pro tubulin  $\alpha$  je esenciální gen *TUB1*. Přítomnost další kopie genu pro tubulin  $\alpha$ , a to jak *TUB1* tak *TUB3*, v genomu nebo na centromerickém plasmidu způsobí nárůst rezistence buněk k benomylu (Schatz *et al.*, 1986b). Také určitá mutace v genu pro tubulin  $\beta$ , *tub2-104*, způsobuje zvýšení rezistence k benomylu (Thomas *et al.*, 1985). Autoři studie zabývající se tímto tématem (Schatz *et al.*, 1986b) tudíž předpokládají, že pro citlivost buněk k benomylu je důležitý poměr tubulinu  $\alpha$  k tubulinu  $\beta$ .

### **6.1.3. Vliv delecí intronů genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1* na termosenzitivitu buněk *prp45(1-169)***

Již dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že kvasinky *S. cerevisiae* nesoucí mutaci *prp45(1-169)* vykazují citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C (Gahura *et al.*, 2009).

V této práci jsme sledovali vliv delecí vybraných intronů na termosenzitivitu *prp45(1-169)* buněk. Nebylo zjištěno, že by v buňkách *PRP45* WT způsobila delece některého z intronů *tub1Δi* nebo *tub3Δi* změnu růstu za zvýšené teploty, ale dvojitá mutace *prp45(1-169) tub3Δi* vedla ke snížení a naopak dvojitá mutace *prp45(1-169) tub1Δi* ke zvýšení termosenzitivity buněk proti buňkám nesoucím pouze mutaci *prp45(1-169)*.

Proteiny Tub1 a Tub3 jsou z 90% totožné, liší se pouze v 39 aminokyselinových zbytcích (Schatz *et al.*, 1986a). Odlišné aminokyselinové zbytky se v monomerech tubulinů často vykytují blízko sebe, a tvoří tak „clusters“. Některá místa aminokyselinových záměn se nachází v oblasti interakce monomerů  $\alpha$  a  $\beta$  při tvorbě dimeru a jiná je možné pozorovat v oblastech interakce dimerů. Tyto záměny tak mohou mít vliv na dynamiku mikrotubulů. Jedenáct aminokyselinových záměn je provázeno změnou náboje v daném místě. Může tak dojít k ovlivnění interakcí mezi protofilamenty a také ke změně ve schopnosti vazby na povrch těchto mikrotubulů u některých proteinů. Další zajímavé aminokyselinové záměny jsou změny na třech místech, na kterých se v Tub1 vyskytuje prolin. Tyto změny totiž mohou vést ke změně konformace a také ovlivnit stabilitu mikrotubulu (Bode *et al.*, 2003).

Je známo, že *in vitro* připravené mikrotubuly obsahující Tub3 jako jediný tubulin  $\alpha$  jsou méně dynamické než mikrotubuly s přirozeným poměrem Tub1 a Tub3, a naopak mikrotubuly obsahující pouze Tub1 jsou více dynamické než mikrotubuly divokého typu. U mikrotubulů obsahujících Tub1 jako jediný tubulin  $\alpha$  byl například pozorován až 30% nárůst frekvence rychlé depolymerace nazývané „katastrofa mikrotubulu“ v porovnání s buňkami divokého typu (Bode *et al.*, 2003).

Delece intronů z genů *TUB1* a *TUB3* mohla v buňkách *prp45(1-169)* změnit jejich expresi a způsobit změnu jejich hladiny proteinu. Je-li pro stabilitu mikrotubulů důležitý poměr Tub1 a Tub3, pak mutace *prp45(1-169)* může způsobit změnu stability mikrotubulů, která se následně projeví změnou citlivosti buněk na zvýšenou teplotu 37°C. Tak by se dal možná vysvětlit rozdíl ve vlivu delecí intronu z těchto jinak vysoce homologních proteinů na termosenzitivitu buněk *prp45(1-169)*.

Dále jsme sledovali vliv delece intronu z genu *COF1* na citlivost buněk *prp45(1-169)* ke zvýšené teplotě 37°C. Samotná delece *cof1Δi* nezpůsobila změnu růstu kvasinek za zvýšené teploty, ale u kvasinek s dvojitou mutací *prp45(1-169) cof1Δi* bylo možné pozorovat mírné snížení citlivosti na teplotu 37°C v porovnání s mutantou *prp45(1-169)*. Z výsledků RT-qPCR vyplývá, že buňky *prp45(1-169)* mají sníženou hladinu *COF1* mRNA. U buněk *prp45(1-169) cof1Δi* byl pozorován návrat hladiny *COF1* mRNA na úroveň WT buněk. Je tedy možné, že delece intronu z genu *COF1* odstraní snížení hladiny cofilinu v buňkách *prp45(1-169)* způsobené zhoršeným sestřihem *COF1* intronu. Tím dojde ke zlepšení životaschopnosti mutantních buněk, které se projeví i částečným poklesem termosenzitivity.

#### **6.1.4. Vliv delecí intronů genů *TUB1* a *TUB3* na citlivost buněk k benomylu**

V naší laboratoři byly připraveny dvě čtveřice kmenů pro studium delece *tub1Δi*: Kmen KGY823 (WT) a od něj odvozené kmeny TSY01: *prp45(1-169)*, KGY2914: *tub1Δi* a TSY02: *prp45(1-169) tub1Δi* (Šimonová, 2006). Druhá čtveřice, získaná mutacemi v kmeni JPY10H7 (WT), zahrnuje dále kmeny AVY47: *prp45(1-169)*, JPY12F8: *tub1Δi* a JKY01: *prp45(1-169) tub1Δi*. U kmene JPY12F8 neměla delece intronu *tub1Δi* vliv na citlivost k benomylu, což vyplývá jak z výsledků studie jejich autorů (Parenteau *et al.*, 2008), tak z našich vlastních výsledků. Naopak všechny kmeny TSY01, KGY2914 a TSY02 byly hypersenzitivní k tomuto mikrotubulárnímu inhibitoru. Rozdíl v citlivosti u buněk s delecí stejného intronu *tub1Δi* je možné vysvětlit jedině rozdílným genetickým pozadím těchto kmenů.

Pro toto tvrzení je možné nalézt oporu v literatuře. Například v jedné práci bylo u buněk s delecí intronu *act1Δi* detekováno snížení hladiny *ACT1* mRNA na 73% množství mRNA buněk s intronem (Juneau *et al.*, 2006), ale v jiné studii nebyl žádný rozdíl v hladině mRNA genu *ACT1* u kmene s mutací *act1Δi* v porovnání s buňkami divokého typu pozorován (Parenteau *et al.*, 2008).

Byla popsána řada genů pro sestřihové faktory jejich mutace nebo delece vede k zastavení buněčného cyklu v G2/M přechodu tj. ve fázi s nesegregovanými chromosomy a dvojnásobným množstvím DNA. Některé z těchto mutací zároveň způsobují citlivost k mikrotubulárním inhibitorům benomylu nebo nocodazolu (viz Teoretický úvod, Vztah buněčného cyklu a sestřihu pre-mRNA *TUB1* a *TUB3*). Fenotyp mnoha těchto mutací bylo možné ovlivnit delecí intronu z genu *TUB1* a expresí cDNA *TUB1* nebo *TUB3*. V mnoha těchto mutantních buňkách byl pozorován poškozený sestřih intronů genů pro tubulin  $\alpha$ .

V případě genu *PRP45* bylo zjištěno, že delece obou intronů *tub1Δi* i *tub3Δi* u buněk s mutací *prp45(1-169)* vede ke snížení citlivosti k benomylu (kmeny JKY01 a JKY02), zároveň ale bylo pomocí RT-qPCR zjištěno, že kvasinky *prp45(1-169)* nemají signifikantně sníženu hladinu mRNA ani *TUB1* ani *TUB3*. Není tedy zcela jasné proč jsou buňky *prp45(1-169)* citlivé na mikrotubulární inhibitor. Vzhledem k tomu, že pomocí RT-qPCR nebyly pozorovány rozdíly v hladině mRNA buněk divokého typu, *prp45(1-169)* a *prp45(1-169) tub1Δi* (viz též dále), pak není snadno vysvětlitelný ani vliv delece intronu *tub1Δi* na *prp45(1-169)* buňky a jejich fenotyp.

## **6.2. Exprese genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* sledovaná metodou RT qPCR**

### **6.2.1. Vliv delece intronu z genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1* a mutace *prp45(1-169)* na hladinu mRNA těchto genů**

Pomocí metody RT qPCR jsme sledovali hladinu mRNA několika genů. Zároveň jsme zjišťovali, jaký vliv na tuto hladinu má delece intronu z těchto genů a mutace *prp45(1-169)*. Metoda RT qPCR zahrnuje reverzní transkripci tj. převedení RNA na cDNA, amplifikaci cDNA PCR za použití primerů specifických pro určitou sekvenci RNA, detekci a kvantifikaci produktů během PCR pomocí fluorescence.

Ve výsledných hodnotách nebyl pozorován žádný vliv delece intronu z genu *TUB1* ani mutace v genu *PRP45* na hladinu *TUB1* mRNA. Buňky *prp45(1-169)*, *tub1Δi* a *prp45(1-169) tub1Δi* měly srovnatelnou hladinu mRNA *TUB1* jako buňky divokého typu.

Mutace *prp45(1-169)* neměla vliv na hladinu *TUB3* mRNA. Delece intronu *tub3Δi* vedla ke zvýšení hladiny *TUB3* mRNA. Tuto skutečnost ve své studii zaznamenali autoři, kteří nám tento kmen poskytli (Parenteau *et al.*, 2008). Autoři zřejmě nepokládali toto zvýšení za významné a tudíž jej ve své práci nijak nekomentovali. Buňky s dvojitou mutací *prp45(1-169) tub3Δi* obsahují zvýšené množství mRNA *TUB3*, a to jak v porovnání s buňkami divokého typu tak i s buňkami *prp45(1-169)* a buňkami *tub3Δi*.

V několika pracích byl pozorován vliv některých intronů na genovou expresi (Juneau *et al.*, 2006; Parenteau *et al.*, 2008). Je tudíž možné, že odstranění intronu genu *TUB3* může ovlivnit expresi tohoto genu a tím způsobit mírné nabohacení *TUB3* mRNA, a že je tato regulace nějakým způsobem spojena i s produktem genu *PRP45*, což by mohlo být důvodem k pozorovanému výraznějšímu zvýšení hladiny mRNA u kmene *prp45(1-169) tub3Δi*.

Dále jsme zjistili, že mutace *prp45(1-169)* způsobí pokles hladiny mRNA *COF1*. Tento defekt bylo ale možné kompenzovat delecí intronu *cof1Δi*. Hladina *COF1* mRNA byla v buňkách *prp45(1-169) cof1Δi* podobná jako v buňkách divokého typu. Z tohoto výsledku je možné usuzovat, že sestřih *COF1* intronu je mutací *prp45(1-169)* poškozen. Byl také pozorován, v porovnání s buňkami divokého typu, mírný pokles hladiny mRNA *COF1* v buňkách nesoucích pouze delecí intronu *cof1Δi*. Tento efekt ve výsledcích studie od jejíž autorů jsme tento kmen dostali nebyl zaznamenán (Parenteau *et al.*, 2008). Je tak možné, že tento jev není významný a při dalších opakováních nebude patrný.

#### **6.2.2. Vliv mutace *prp45(1-169)* na hladinu pre-mRNA sledovaných genů**

Nejprve byly pro získání dalších výsledků pomocí RT-qPCR navrženy dvojice primerů vážící se na intronovou RNA. Primery pro intron obsahující RNA genů *TUB1*, *TUB3* a *ACT1* byly navrženy tak, že jeden z nich se váže na sekvenci v intronu před místem větvení (branch site, BS) a druhý primer se váže za BS. Tyto primery tudíž detekují pouze RNA, která není v místě větvení spojená, tj. pre-mRNA případně též degradační produkt sestřihu, kde již došlo k rozštěpení větvení lariátové struktury („debranching“). Další dvojice primerů pro geny *TUB3* a *COF1* páruje se sekvencí intronu za BS. Tyto primery tak mohou kromě pre-mRNA a degradačního produktu po sestřihu detekovat i lariát-exon 2 RNA, tj. RNA po prvním kroku sestřihu, i lariátovou strukturu, která sestřihem pre-mRNA vznikla.

Ze získaných dat vyplývá, že buňky *prp45(1-169)* obsahují v porovnání s buňkami divokého typu výrazně více intron obsahující RNA všech testovaných genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1*. Toto nabohacení bylo možné pozorovat u obou testovaných kmenů nesoucích mutaci *prp45(1-169)*.



Pro zjištění jaké struktury nebohacená intronová RNA odpovídá, navrhli jsme pro RT-qPCR další dvojice primerů detekující pouze pre-mRNA. Pomocí těchto dvojic primerů jsme zaznamenali v buňkách *prp45(1-169)* akumulaci pre-mRNA všech sledovaných genů. (Pre-mRNA se v buňkách divokého typu vyskytuje ve velice malé koncentraci.)

V našich výsledcích není možné pozorovat rozdíl v hladině intron obsahující RNA genu *TUB3* získané pomocí první dvojice primerů (detekující převážně pre-mRNA) proti hladině získané pro druhou dvojici primerů (detekující více typů RNA). U všech genů také není příliš velký rozdíl v nabohacení intron obsahující RNA a pre-mRNA. Z uvedených pozorování je možné vyvodit závěr, že detekovaná intron obsahující RNA je pre-mRNA.

Z výsledků tak vyplývá, že buňky kvasinky *S. cerevisiae* nesoucí mutaci *prp45(1-169)* obsahují výrazně nabohacenou pre-mRNA genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1*.

Tento jev by mohl být důsledkem problémů při sestavování spliceosomu, nebo problémů při přechodu spliceosomu do „aktivní konformace“ což je krok nezbytný pro umožnění první transesterifikační reakce (Staley and Guthrie, 1998). Protein Prp45 do sestřihu vstupuje pravděpodobně spolu s proteiny NTC komplexu tj. před prvním krokem sestřihu (Ohi *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002). Funkce proteinu Prp45 v sestřihu není zatím zcela jasná. Je možné, že se podílí i na prvním kroku sestřihu a tudíž k akumulaci pre-mRNA dochází v důsledku poškození sestřihu v této fázi. Bylo ale zjištěno, že protein Prp45 interaguje s některými faktory o kterých je známo, že se podílí na druhém kroku sestřihu (Gahura *et al.*, 2009). Výsledky některých studií naznačují, že oba kroky sestřihu (obě transesterifikační reakce) mohou být reverzibilní (Tseng and Cheng, 2008). Je tedy možné, že i pokud mutace v genu *PRP45* narušuje až druhý krok sestřihu intronů sledovaných genů, může se toto poškození v důsledku zpětné reakce projevit jako akumulace pre-mRNA.

### 6.2.3. Vliv mutace v intronu genu *COF1* na expresi tohoto genu

Kmen AVY11#31 nese v intronu genu *COF1* mutaci v oblasti za místem větvení, která je synteticky letální s mutací *prp45*(1-169); (Valentová, 2008).

Z našich výsledků získaných pomocí metody RT-qPCR je patrné, že tato mutace výrazně ovlivňuje sestřih intronu. Buňky AVY11#31 obsahují totiž výrazně nižší hladinu mRNA *COF1* než buňky divokého typu a také v nich dochází k výraznému hromadění pre-mRNA *COF1*. Tyto pozorované změny v hladinách RNA jsou srovnatelné s výsledky kmenů nesoucích mutaci v sestřihovém faktoru, *prp45*(1-169). Z toho vyplývá, že poškození sestřihu intronu genu *COF1* v důsledku mutace *prp45*(1-169) je podobně závažné jako poškození sestřihu tohoto genu v důsledku mutace v intronu. Tím by mohla být vysvětlena syntetická letalita *cof1* intronové mutace a mutace *prp45*(1-169), protože v buňkách s dvojitou mutací zřejmě neprobíhá efektivní sestřih *COF1* intronu, tím dochází k extrémnímu poklesu mRNA, a tudíž není v těchto buňkách dostatečná produkce esenciálního cofilinu.

## 7. Souhrn

- Byla potvrzena hypersenzitivita buněk kvasinky *S. cerevisiae* nesoucích ve svém genomu zkrácenou variantu genu *PRP45*, *prp45(1-169)* k látkám benomyl a calcofluor white.
- Bylo zjištěno, že nadprodukce proteinu Tub3 z plazmidu zvyšuje rezistenci k benomylu, a to více v případě buněk *prp45(1-169)* v porovnání s buňkami divokého typu.
- Bylo zjištěno, že delece intronu z genů *TUB1*, *TUB3* a *COF1* ovlivňuje dříve nalezenou citlivost buněk *prp45(1-169)* ke zvýšené kultivační teplotě 37°C. V kmenech JKY01 a JKY02 delece intronu *tub1Δi* a také *tub3Δi* snižuje u buněk nesoucích v genomu mutaci *prp45(1-169)* citlivost k benomylu.
- S použitím metody RT qPCR nebylo zjištěno, že by přítomnost mutace *prp45(1-169)* v kvasinkách *S. cerevisiae* měla vliv na množství celkové a sestřižené RNA genů *TUB1*, *TUB3* a *ACT1*, ale bylo zaznamenáno, že v buňkách nesoucích mutaci *prp45(1-169)* dochází k poklesu hladiny celkové i sestřižené *COF1* RNA v porovnání s buňkami *PRP45* WT. Dále bylo zaznamenáno výrazné nabohacení pre-mRNA genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* v mutantních buňkách *prp45(1-169)*.
- S použitím techniky RT qPCR bylo také zjištěno, že v naší laboratoři objevená mutace v intronu genu *COF1* působí pokles hladiny mRNA *COF1* a výraznou akumulaci *COF1* pre-mRNA.

## 8. Seznam literatury

- Abrhánová, K. (2010). Role proteinu Prp45 v expresi a zrání mRNA. Disertační práce, PřF UK.
- Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C.S., and Beggs, J.D. (2003). Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA* 9, 138-150.
- Ambrozkova, M., Puta, F., Fukova, I., Skruzny, M., Brabek, J., and Folk, P. (2001). The fission yeast ortholog of the coregulator SKIP interacts with the small subunit of U2AF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1148-1154.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D.J., and Koonin, E.V. (2000). Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11319-11324.
- Ares, M., Jr., Grate, L., and Pauling, M.H. (1999). A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA* 5, 1138-1139.
- Barta, I. and Iggo, R. (1995). Autoregulation of expression of the yeast Dbp2p 'DEAD-box' protein is mediated by sequences in the conserved DBP2 intron. *EMBO J.* 14, 3800-3808.
- Baudino, T.A., Kraichely, D.M., Jefcoat, S.C., Jr., Winchester, S.K., Partridge, N.C., and MacDonald, P.N. (1998). Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 273, 16434-16441.
- Ben Yehuda, S., Dix, I., Russell, C.S., McGarvey, M., Beggs, J.D., and Kupiec, M. (2000). Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 1503-1517.
- Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 453-470.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.A. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bode, C.J., Gupta, M.L., Suprenant, K.A., and Himes, R.H. (2003). The two alpha-tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro. *EMBO Rep.* 4, 94-99.
- Bon, E. *et al.* (2003). Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res.* 31, 1121-1135.

- Bres,V., Gomes,N., Pickle,L., and Jones,K.A. (2005). A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev.* *19*, 1211-1226.
- Brys,A. and Schwer,B. (1996). Requirement for SLU7 in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site. *RNA* *2*, 707-717.
- Burns,C.G., Ohi,R., Mehta,S., O'Toole,E.T., Winey,M., Clark,T.A., Sugnet,C.W., Ares,M., Jr., and Gould,K.L. (2002). Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *22*, 801-815.
- Chan,S.P., Kao,D.I., Tsai,W.Y., and Cheng,S.C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* *302*, 279-282.
- Chawla,G., Sapra,A.K., Surana,U., and Vijayraghavan,U. (2003). Dependence of pre-mRNA introns on PRP17, a non-essential splicing factor: implications for efficient progression through cell cycle transitions. *Nucleic Acids Res.* *31*, 2333-2343.
- Chen,X., Sullivan,D.S., and Huffaker,T.C. (1994). Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 9111-9115.
- Clark,T.A., Sugnet,C.W., and Ares,M., Jr. (2002). Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. *Science* *296*, 907-910.
- Dahan,O. and Kupiec,M. (2002). Mutations in genes of *Saccharomyces cerevisiae* encoding pre-mRNA splicing factors cause cell cycle arrest through activation of the spindle checkpoint. *Nucleic Acids Res.* *30*, 4361-4370.
- Dahl,R., Wani,B., and Hayman,M.J. (1998). The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene* *16*, 1579-1586.
- Elorza,M.V., Rico,H., and Sentandreu,R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* *129*, 1577-1582.
- Engbrecht,J.A., Voelkel-Meiman,K., and Roeder,G.S. (1991). Meiosis-specific RNA splicing in yeast. *Cell* *66*, 1257-1268.
- Fink,G.R. (1987). Pseudogenes in yeast? *Cell* *49*, 5-6.
- Folk,P., Puta,F., Krpejsova,L., Blahuskova,A., Markos,A., Rabino,M., and Dottin,R.P. (1996). The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*. *Gene* *181*, 229-231.
- Folk,P., Puta,F., and Skruzny,M. (2004). Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol. Life Sci.* *61*, 629-640.

- Furger,A., O'Sullivan,J.M., Binnie,A., Lee,B.A., and Proudfoot,N.J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* *16*, 2792-2799.
- Gahura,O., Abrahmova,K., Skruzny,M., Valentova,A., Munzarova,V., Folk,P., and Puta,F. (2009). Prp45 Affects Prp22 Partition in Spliceosomal Complexes and Splicing Efficiency of Non-Consensus Substrates. *Journal of Cellular Biochemistry* *106*, 139-151.
- Gallwitz,D. and Seidel,R. (1980). Molecular cloning of the actin gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *8*, 1043-1059.
- Gavin,A.C. *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-147.
- Grund,S.E., Fischer,T., Cabal,G.G., Antunez,O., Perez-Ortin,J.E., and Hurt,E. (2008). The inner nuclear membrane protein Src1 associates with subtelomeric genes and alters their regulated gene expression. *J. Cell Biol.* *182*, 897-910.
- Haarer,B.K., Lillie,S.H., Adams,A.E., Magdolen,V., Bandlow,W., Brown,S.S. (1990). Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol.* *110*, 105-114
- Iida,K., Moriyama,K., Matsumoto,S., Kawasaki,H., Nishida,E., and Yahara,I. (1993). Isolation of a yeast essential gene, COF1, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein. *Gene* *124*, 115-120.
- Johnston,G.C., Prendergast,J.A., Singer,R.A. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J Cell Biol.* *113*, 539-551
- Juneau,K., Miranda,M., Hillenmeyer,M.E., Nislow,C., and Davis,R.W. (2006). Introns regulate RNA and protein abundance in yeast. *Genetics* *174*, 511-518.
- Juneau,K., Nislow,C., and Davis,R.W. (2009). Alternative splicing of PTC7 in *Saccharomyces cerevisiae* determines protein localization. *Genetics* *183*, 185-194.
- Juneau,K., Palm,C., Miranda,M., and Davis,R.W. (2007). High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 1522-1527.
- Kivens,W. and Siliciano,P.G. (1996). RNA sequences upstream of the 3' splice site repress splicing of mutant yeast ACT1 introns. *RNA* *2*, 492-505.
- Lander,E.S. *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Leong,G.M., Subramaniam,N., Figueroa,J., Flanagan,J.L., Hayman,M.J., Eisman,J.A., and Kouzmenko,A.P. (2001). Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* *276*, 18243-18248.

- Li,B., Vilardell,J., and Warner,J.R. (1996). An RNA structure involved in feedback regulation of splicing and of translation is critical for biological fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1596-1600.
- Liu,K., Sandgren,E.P., Palmiter,R.D., and Stein,A. (1995). Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment in vitro and in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7724-7728.
- Lundgren,K., Allan,S., Urushiyama,S., Tani,T., Ohshima,Y., Frendewey,D., and Beach,D. (1996). A connection between pre-mRNA splicing and the cell cycle in fission yeast: *cdc28+* is allelic with *prp8+* and encodes an RNA-dependent ATPase/helicase. *Mol. Biol. Cell* 7, 1083-1094.
- Lussier,M. *et al.* (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147, 435-450.
- Makarov,E.M., Makarova,O.V., Urlaub,H., Gentzel,M., Will,C.L., Wilm,M., and Luhrmann,R. (2002). Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* 298, 2205-2208.
- Martinkova,K., Lebduska,P., Skruzny,M., Folk,P., and Puta,F. (2002). Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *J. Biochem.* 132, 557-563.
- Moon,A. and Drubin,D.G. (1995). The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 6, 1423-1431.
- Moon,A.L., Janmey,P.A., Louie,K.A., and Drubin,D.G. (1993). Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 120, 421-435.
- Mullins,R.D., Kelleher,J.F., and Pollard,T.D. (1996). Actin' like actin? *Trends Cell Biol.* 6, 208-212.
- Nakagawa,T. and Ogawa,H. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis. *EMBO J.* 18, 5714-5723.
- Neff,N.F., Thomas,J.H., Grisafi,P., and Botstein,D. (1983). Isolation of the beta-tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. *Cell* 33, 211-219.
- Ng,R. and Abelson,J. (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3912-3916.
- Novick,P., Botstein,D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* 40, 405-416
- Ohi,M.D., Link,A.J., Ren,L., Jennings,J.L., McDonald,W.H., and Gould,K.L. (2002). Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol. Cell Biol.* 22, 2011-2024.

- Ooi,S.L., Samarsky,D.A., Fournier,M.J., and Boeke,J.D. (1998). Intronic snoRNA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the lariat-debranching enzyme: intron length effects and activity of a precursor snoRNA. *RNA* 4, 1096-1110.
- Parenteau,J. *et al.* (2008). Deletion of many yeast introns reveals a minority of genes that require splicing for function. *Mol. Biol. Cell* 19, 1932-1941.
- Prathapam,T., Kuhne,C., and Banks,L. (2001). The HPV-16 E7 oncoprotein binds Skip and suppresses its transcriptional activity. *Oncogene* 20, 7677-7685.
- Prathapam,T., Kuhne,C., and Banks,L. (2002). Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acids Res.* 30, 5261-5268.
- Preker,P.J., Kim,K.S., and Guthrie,C. (2002). Expression of the essential mRNA export factor Yra1p is autoregulated by a splicing-dependent mechanism. *RNA* 8, 969-980.
- Revers,L.F., Cardone,J.M., Bonatto,D., Saffi,J., Grey,M., Feldmann,H., Brendel,M., and Henriques,J.A. (2002). Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele *pso4-1*. *Nucleic Acids Res.* 30, 4993-5003.
- Reed,S.I., Hadwiger,J.A., Richardson,H.E., Wittenberg,C. (1989). Analysis of the Cdc28 protein kinase complex by dosage suppression. *J Cell Sci Suppl* 12, 29-37.
- Rodriguez-Navarro,S., Igual,J.C., and Perez-Ortin,J.E. (2002). SRC1: an intron-containing yeast gene involved in sister chromatid segregation. *Yeast* 19, 43-54.
- Russell,C.S., Ben Yehuda,S., Dix,I., Kupiec,M., and Beggs,J.D. (2000). Functional analyses of interacting factors involved in both pre-mRNA splicing and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 6, 1565-1572.
- Santos,B., Snyder,M. (1997) Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol.* 136, 95-110
- Schatz,P.J., Pillus,L., Grisafi,P., Solomon,F., and Botstein,D. (1986a). Two functional alpha-tubulin genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encode divergent proteins. *Mol. Cell Biol.* 6, 3711-3721.
- Schatz,P.J., Solomon,F., and Botstein,D. (1986b). Genetically essential and nonessential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol. Cell Biol.* 6, 3722-3733.
- Schiestl,R.H., Gietz,R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* 16, 339-346.
- Schott,D., Huffaker,T., and Bretscher,A. (2002). Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 564-574.
- Schwer,B. and Gross,C.H. (1998). Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 17, 2086-2094.



- Shea, J.E., Toyn, J.H., and Johnston, L.H. (1994). The budding yeast U5 snRNP Prp8 is a highly conserved protein which links RNA splicing with cell cycle progression. *Nucleic Acids Res.* 22, 5555-5564.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sleckman, B.P., Gorman, J.R., and Alt, F.W. (1996). Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 459-481.
- Sobel, S.G. and Snyder, M. (1995). A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131, 1775-1788.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., and Ares, M., Jr. (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 5, 221-234.
- Staley, J.P. and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Stearns, T., Hoyt, M.A., and Botstein, D. (1990). Yeast mutants sensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function. *Genetics* 124, 251-262.
- Šimonová, T. (2006). Fenotyp *Saccharomyces cerevisiae* s delecí v genu *PRP45*. Diplomová práce, PřF UK.
- Tang, J., Chang, H.Y., and Yang, X. (2005). The death domain-associated protein modulates activity of the transcription co-factor Skip/NcoA62. *FEBS Lett.* 579, 2883-2890.
- Tarn, W.Y., Hsu, C.H., Huang, K.T., Chen, H.R., Kao, H.Y., Lee, K.R., and Cheng, S.C. (1994). Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J.* 13, 2421-2431.
- Thomas, J. H., Neff, N.F., and Botstein, D. (1985). Isolation and characterization of mutations in the beta-tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 112, 715-734.
- Tseng, C.K., Cheng, S.C. (2008). Both catalytic steps of nuclear pre-mRNA splicing are reversible. *Science*. 320, 1782-1784.
- Umen, J.G. and Guthrie, C. (1995). A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. *Genes Dev.* 9, 855-868.
- Vaillant, C., Palmeira, L., Chevereau, G., Audit, B., d'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C., and Arneodo, A. (2010). A novel strategy of transcription regulation by intragenic nucleosome ordering. *Genome Res.* 20, 59-67.

- Van Driessche,B., Tafforeau, L., Hentges,P., Carr,A.M., Vandenhaute,J. (2005). Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast*. 22, 1061-1068
- Valentová,A. (2008). Genetické interakce mutace *PRP45* v *S. cerevisiae*. Diplomová práce, PřF UK.
- Venter,J.C. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Vijayraghavan,U., Company,M., and Abelson,J. (1989). Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 3, 1206-1216.
- Villa,T., Ceradini,F., Presutti,C., and Bozzoni,I. (1998). Processing of the intron-encoded U18 small nucleolar RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* relies on both exo- and endonucleolytic activities. *Mol. Cell Biol.* 18, 3376-3383.
- Weinstein,B. and Solomon,F. (1990). Phenotypic consequences of tubulin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: differences between alpha-tubulin and beta-tubulin. *Mol. Cell Biol.* 10, 5295-5304.
- Winsor,B. and Schiebel,E. (1997). Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* 13, 399-434.
- Zhang,C., Dowd,D.R., Staal,A., Gu,C., Lian,J.B., van Wijnen,A.J., Stein,G.S., and MacDonald,P.N. (2003). Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 278, 35325-35336.
- Zhang,X. and Schwer,B. (1997). Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* 25, 2146-2152.
- Zhou,S., Fujimuro,M., Hsieh,J.J., Chen,L., Miyamoto,A., Weinmaster,G., and Hayward,S.D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol. Cell Biol.* 20, 2400-2410.

Použité databáze:

SGD: <http://www.yeastgenome.org/>

Ares lab Yeast Intron Database: <http://metarray.ucsc.edu/cgi-bin/intron/yirIntrondb>